

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 9/16, 15/82 // 9/00, 9/88, A01H 5/00	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/06831 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 19. Februar 1998 (19.02.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/04311 (22) Internationales Anmeldedatum: 7. August 1997 (07.08.97) (30) Prioritätsdaten: 196 32 121.2 8. August 1996 (08.08.96) DE 196 33 374.1 19. August 1996 (19.08.96) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Berlin (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WILLMITZER, Lothar [DE/DE]; Arnold-Knoblauch-Ring 1, D-14109 Berlin (DE). MÜLLER-RÖBER, Bernd [DE/DE]; Eichenring 28, D-14469 Potsdam (DE). LA COGNATA, Ursula [DE/DE]; Kaiser-Wilhelm-Strasse 96, D-12247 Berlin (DE). BÄUERLEIN, Michael [DE/DE]; Graefestrasse 9, D-10967 Berlin (DE). (74) Anwalt: VOSSIUS & PARTNER GBR; Postfach 86 07 67, D-81634 München (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(54) Title: TRANSGENIC PLANT CELLS AND PLANTS WITH MODIFIED ACETYL-CoA FORMATION (54) Bezeichnung: TRANSGENE PFLANZENZELLEN UND PFLANZEN MIT VERÄNDERTER ACETYL-CoA-BILDUNG (57) Abstract <p>The invention concerns transgenic plant cells and plants having increased acetyl-coA hydrolase activity. The increased coA hydrolase activity is achieved by introducing and expressing a DNA sequence which codes for an acetyl-coA hydrolase, preferably a deregulated or unregulated acetyl-coA hydrolase, in plant cells. The invention further concerns processes and recombinant DNA molecules for producing plant cells and plants having increased acetyl-coA hydrolase activity.</p> (57) Zusammenfassung <p>Es werden transgene Pflanzenzellen und Pflanzen mit einer gesteigerten Acetyl-CoA-Hydrolase-Aktivität beschrieben. Die Steigerung der Acetyl-CoA-Hydrolase-Aktivität wird erreicht durch die Einführung und Expression einer DNA-Sequenz, die eine Acetyl-CoA-Hydrolase, vorzugsweise eine deregulierte oder unregulierte Acetyl-CoA-Hydrolase, codiert, in pflanzlichen Zellen. Ferner werden Verfahren und rekombinante DNA-Moleküle zur Herstellung von Pflanzenzellen und Pflanzen mit gesteigerter Acetyl-CoA-Hydrolase-Aktivität beschrieben.</p>		

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. Aktenzeichen

PCT/EP 97/04311

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0348958 A	03-01-90	AU 3849889 A DK 307390 A WO 9000003 A US 5487990 A	23-01-90 12-02-91 11-01-90 30-01-96
WO 9524487 A	14-09-95	DE 4408629 A DE 4435366 A DE 4438821 A AU 2067995 A CA 2184741 A EP 0748381 A HU 76093 A	14-09-95 28-03-96 25-04-96 25-09-95 14-09-95 18-12-96 30-06-97
WO 9520046 A	27-07-95	FR 2715404 A AU 1576395 A ZA 9500591 A	28-07-95 08-08-95 10-01-96
DE 4317260 A	28-07-94	CA 2150678 A WO 9417188 A EP 0680511 A JP 8509116 T	04-08-94 04-08-94 08-11-95 01-10-96



PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation⁶: C12N 9/16, 15/82 // 9/00, 9/88, A01H 5/00	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/06831 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 19. Februar 1998 (19.02.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/04311 (22) Internationales Anmeldedatum: 7. August 1997 (07.08.97) (30) Prioritätsdaten: 196 32 121.2 8. August 1996 (08.08.96) DE 196 33 374.1 19. August 1996 (19.08.96) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Berlin (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WILLMITZER, Lothar [DE/DE]; Arnold-Knoblauch-Ring 1, D-14109 Berlin (DE). MÜLLER-RÖBER, Bernd [DE/DE]; Eichenring 28, D-14469 Potsdam (DE). LA COGNATA, Ursula [DE/DE]; Kaiser-Wilhelm-Strasse 96, D-12247 Berlin (DE). BÄUERLEIN, Michael [DE/DE]; Graefestrasse 9, D-10967 Berlin (DE). (74) Anwalt: VOSSIUS & PARTNER GBR; Postfach 86 07 67, D-81634 München (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(54) Title: TRANSGENIC PLANT CELLS AND PLANTS WITH MODIFIED ACETYL-CoA FORMATION (54) Bezeichnung: TRANSGENE PFLANZENZELLEN UND PFLANZEN MIT VERÄNDERTER ACETYL-CoA-BILDUNG (57) Abstract <p>The invention concerns transgenic plant cells and plants having increased acetyl-coA hydrolase activity. The increased coA hydrolase activity is achieved by introducing and expressing a DNA sequence which codes for an acetyl-coA hydrolase, preferably a deregulated or unregulated acetyl-coA hydrolase, in plant cells. The invention further concerns processes and recombinant DNA molecules for producing plant cells and plants having increased acetyl-coA hydrolase activity.</p> (57) Zusammenfassung <p>Es werden transgene Pflanzenzellen und Pflanzen mit einer gesteigerten Acetyl-CoA-Hydrolase-Aktivität beschrieben. Die Steigerung der Acetyl-CoA-Hydrolase-Aktivität wird erreicht durch die Einführung und Expression einer DNA-Sequenz, die eine Acetyl-CoA-Hydrolase, vorzugsweise eine deregulierte oder unregulierte Acetyl-CoA-Hydrolase, codiert, in pflanzlichen Zellen. Ferner werden Verfahren und rekombinante DNA-Moleküle zur Herstellung von Pflanzenzellen und Pflanzen mit gesteigerter Acetyl-CoA-Hydrolase-Aktivität beschrieben.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Verinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Transgene Pflanzenzellen und Pflanzen mit veränderter Acetyl-CoA-Bildung

Die vorliegende Erfindung betrifft transgene Pflanzenzellen und Pflanzen mit einem im Vergleich zu nicht-transformierten Pflanzen veränderten Acetyl-CoA-Metabolismus und mit einer veränderten Fähigkeit zur Bildung und Verwertung von Acetyl-CoA (Acetyl-Coenzym A). Die Veränderung der Fähigkeit zur Produktion und Verwendung von Acetyl-CoA wird erreicht durch die Einführung und Expression einer DNA-Sequenz, die eine Acetyl-CoA-Hydrolase, vorzugsweise eine deregulierte oder unregulierte Acetyl-CoA-Hydrolase codiert, in pflanzlichen Zellen. Die Erfindung betrifft ebenfalls die Verwendung von DNA-Sequenzen, die eine Acetyl-CoA-Hydrolase codieren, zur Erhöhung der Acetyl-CoA-Hydrolaseaktivität in pflanzlichen Zellen, insbesondere zur Herstellung von transgenen Pflanzenzellen und Pflanzen, mit veränderter Fähigkeit zur Bildung und Verwertung von Acetyl-CoA.

Bedingt durch den kontinuierlich steigenden Bedarf an Lebensmitteln, der aus der ständig wachsenden Weltbevölkerung resultiert, ist eine der Aufgaben der biotechnologischen Forschung, sich um eine Steigerung des Ertrags von Nutzpflanzen zu bemühen. Eine Möglichkeit, dies zu erreichen, besteht in der gezielten gentechnischen Veränderung des Metabolismus von Pflanzen. Ziele sind dabei beispielsweise die Primärprozesse der Photosynthese, die zur CO₂-Fixierung führen, die Transportprozesse, die an der Verteilung der Photoassimilate innerhalb der Pflanze beteiligt sind, als auch Stoffwechselwege, die zur Synthese von Speicherstoffen, z.B. von Stärke, Proteinen, Fetten, Ölen, Gummistoffen, oder von Sekundärmetaboliten wie z.B. Flavonoiden, Steroiden, Isoprenoiden (z.B. Aromastoffe), Pigmenten, oder Polyketiden (Antibiotika), oder von pflanzlichen Pathogenabwehrstoffen führen. Während sich viele Anwendungen mit den Schritten beschäftigen, die entweder zur Bildung von Photoassimilaten in Blättern führen (vgl. auch EP-A 0 466 995) oder aber mit der

Bildung von Polymeren wie Stärke oder Fructanen in Speicherorganen transgener Pflanzen (z.B. WO 94/04692), gibt es bisher keine erfolgversprechenden Ansätze, die beschreiben, welche Modifikationen in den primären Stoffwechselwegen einzuführen sind, um eine Veränderung der Fähigkeit zur Bildung und Verwertung von Acetyl-CoA zu erreichen. Eine Veränderung der Fähigkeit zur Bildung und Verwertung von Acetyl-CoA ist z.B. für alle jene Prozesse in der Pflanze von Bedeutung, für die größere Mengen von Acetyl-CoA benötigt werden. Dies gilt z.B. für viele biochemische Prozesse in pflanzlichen Zellen, an denen Acetyl-CoA als Substrat oder Abbauprodukt beteiligt ist. Eine Veränderung der Acetyl-CoA-Bildungsrate ist insbesondere von Bedeutung für die Bildung von Stärke, Proteinen, Fetten, Ölen, Gummistoffen, oder von Sekundärmetaboliten wie Flavonoiden, Steroiden, Isoprenoiden (Aromastoffe, Pigmente), oder Polyketiden (Antibiotika). Da Pflanzen sich aufgrund verschiedener Eigenschaften zur Herstellung verschiedener der oben genannten Stoffe in großem Maßstab eignen würden, besteht ein Bedarf an Pflanzen, bei denen die Bildung und Verteilung von Acetyl-CoA in den Zellen derart verändert ist, daß die Bildung der oben beschriebenen Stoffe beeinflusst wird.

Somit liegt der vorliegenden Erfindung die Aufgabe zugrunde, Pflanzenzellen und Pflanzen mit einer veränderten Fähigkeit zur Bildung und Verwertung von Acetyl-CoA sowie Verfahren zu deren Herstellung zur Verfügung zu stellen.

Die Lösung dieser Aufgabe wird durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen bezeichneten Ausführungsformen bereitgestellt.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung transgene Pflanzenzellen mit einem veränderten Acetyl-CoA-Metabolismus, die aufgrund der Expression einer fremden DNA-Sequenz, die ein Protein mit Acetyl-CoA-Hydrolaseaktivität codiert, eine im Vergleich zu Wildtyp-, d.h. nicht-transformierten, Zellen

erhöhte Acetyl-CoA-Hydrolaseaktivität aufweisen. Die Expression einer derartigen DNA-Sequenz führt in den transgenen pflanzlichen Zellen zur Steigerung der intrazellulären Acetyl-CoA-Hydrolaseaktivität. Acetyl-CoA-Hydrolasen sind Enzyme, die die folgende Reaktion katalysieren:



Es wurde überraschenderweise gefunden, daß die Steigerung der Acetyl-CoA-Hydrolaseaktivität in verschiedenen Kompartimenten pflanzlicher Zellen möglich ist und somit eine Einflußnahme auf die intrazelluläre Verteilung von Metaboliten ermöglicht wird. Dieses Ergebnis ist insofern überraschend, als daß Acetyl-CoA einer der zentralen Stoffwechselmetaboliten in pflanzlichen und tierischen Zellen ist, dessen Konzentration strikt reguliert ist (Randall und Miernyk, Methods in Plant Biochemistry Vol 3 [ISBN 0-12-461013-7]). Ein Eingriff in die intrazelluläre Acetyl-CoA-Verteilung sollte somit drastische Auswirkungen auf die Lebensfähigkeit der Zellen haben. Beispielsweise gibt es Hinweise darauf, daß die Expression der Acetyl-CoA-Hydrolase aus Hefe in *E. coli* einen letalen Effekt hat. Demgegenüber basiert die vorliegende Erfindung auf der Tatsache, daß eine Steigerung der Acetyl-CoA-Hydrolaseaktivität in pflanzlichen Zellen in der Tat möglich ist und zu vorteilhaften Eigenschaften der pflanzlichen Zellen führt. Beispielsweise wurde gefunden, daß die Steigerung der Acetyl-CoA-Hydrolaseaktivität in den Mitochondrien in den Blättern transgener Pflanzen zu einer Erhöhung des Gehaltes an löslichen Zuckern, wie z.B. Glucose, Fructose und Saccharose, sowie von Stärke führt und zur gleichzeitigen Reduktion des Gehaltes an Fettsäuren. D.h. die Steigerung der mitochondrialen Acetyl-CoA-Hydrolaseaktivität ermöglicht eine Veränderung der Partitionierung von Photoassimilaten in den Zellen. Die Acetyl-CoA-Hydrolaseaktivität in den erfindungsgemäßen Zellen ist vorzugsweise um mindestens 50% und besonders bevorzugt um 100% im Vergleich zu nicht-transformierten Zellen erhöht. Beson-

ders vorteilhaft ist eine Steigerung der Enzymaktivität um mehr als 150% im Vergleich zu nicht-transformierten Zellen. Die Steigerung der Acetyl-CoA-Hydrolaseaktivität führt zu einer erhöhten Konzentration an Acetat. Im Gegensatz zu Acetyl-CoA kann Acetat zelluläre Membranen unreguliert durchdringen. Somit steht es in anderen zellulären Kompartimenten in höherer Konzentration als Substrat für die durch die Acetyl-CoA-Synthetase katalysierte Reaktion der Acetyl-CoA-Synthese zur Verfügung. Dies bedeutet, daß es möglich ist, durch die Steigerung der Acetyl-CoA-Hydrolaseaktivität in einem Kompartiment, die intrazelluläre Verteilung von Acetyl-CoA zu verändern und somit Einfluß auf den Fluß von Metaboliten in verschiedene Biosynthesewege zu nehmen.

In einer bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung transgene Pflanzenzellen, bei denen die Acetyl-CoA-Hydrolaseaktivität in den Mitochondrien erhöht ist. In Pflanzenzellen erfolgt die Biosynthese von Acetyl-CoA in den Mitochondrien durch die durch den Pyrurat-Dehydrogenase-Multienzymkomplex katalysierte Umsetzung von Pyrurat. Die Steigerung der Acetyl-CoA-Hydrolaseaktivität in den Mitochondrien führt zu einer erhöhten Konzentration von Acetat, das durch zelluläre Membranen in andere Kompartimente, z.B. ins Cytosol diffundieren kann. Hier kann es wiederum für die Synthese von Acetyl-CoA, z.B. durch die Acetyl-CoA-Synthetase verwendet werden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform zeigen die erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen daher eine gesteigerte Aktivität der Acetyl-CoA-Synthetase im Cytosol. Dieses Enzym katalysiert die folgende Reaktion



Das vermehrt im Cytosol gebildete Acetyl-CoA kann beispielsweise für eine verstärkte Synthese von Isoprenoiden über Me-

valonsäure und Isopentenylpyrophosphat genutzt werden (Bach, Lipids 30 (1995), 191-202).

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform ist die Acetyl-CoA-Hydrolaseaktivität in dem Cytosol der transgenen Pflanzenzellen erhöht. Hierdurch wird wiederum eine erhöhte Acetatkonzentration erreicht. Diese kann beispielsweise dazu führen, daß mehr Acetat in den Plastiden zur Verfügung steht und in diesen zu Acetyl-CoA umgewandelt wird. Damit stünde verstärkt Acetyl-CoA als Substrat z.B. für die Fettsäurebiosynthese oder die Isoprenoidsynthese zur Verfügung.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform zeigen die erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen mit einer gesteigerten Acetyl-CoA-Hydrolaseaktivität in den Mitochondrien oder dem Cytosol darüber hinaus eine erhöhte Aktivität der Acetyl-CoA-Synthetase in den Plastiden. Hierdurch kann die Verlagerung von Acetat in die Plastiden und dessen Umwandlung in Acetyl-CoA verstärkt werden. Dieses steht dann beispielsweise in erhöhtem Maße für die Fettsäurebiosynthese zur Verfügung.

Möglich ist im Prinzip auch die Reduktion der Acetyl-CoA-Synthetaseaktivität im Cytosol.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform weisen die oben beschriebenen pflanzlichen Zellen eine verringerte Aktivität der Citratsynthase in den Mitochondrien auf. Dieses Enzym katalysiert die folgende Reaktion:

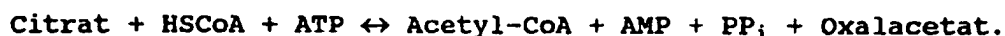


Durch die Verringerung der Aktivität dieses Enzyms, das Acetyl-CoA als Substrat für die Citratsynthese verwendet, steht mehr Acetyl-CoA für die durch die Acetyl-CoA-Hydrolase katalysierte Reaktion zur Verfügung, was zu einer verstärkten Bildung von Acetat führt.

Eine andere bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung sieht vor, daß in den oben beschriebenen erfindungsgemäßen Pflanzenzellen in den Mitochondrien oder dem Cytosol die Aktivität der Citratsynthase erhöht ist.

Eine derartige Steigerung der Aktivität der Citratsynthase kann zu einer Veränderung des Flusses von Metaboliten hin zu Acetyl-CoA in ein bestimmtes subzelluläres Kompartiment führen, und kann insbesondere eine Steigerung der Biosynthese von Fettsäuren bzw. Lipiden hervorrufen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung weisen die oben beschriebenen erfindungsgemäßen Pflanzenzellen ferner eine verringerte Aktivität der ATP-Citratlyase im Cytosol auf. Dieses Enzym katalysiert die folgende Reaktion:



Eine derartige Verringerung kann zu einer Steigerung des metabolischen Flusses von Citrat zu Acetyl-CoA führen, was einen Rückstau von Metaboliten im Citratcyclus hervorrufen kann. Möglich wäre folglich eine verstärkte Bildung von Acetat über die endogene Acetyl-CoA-Hydrolase, wodurch die Bildung von Lipiden und/oder Terpenoiden erhöht werden kann.

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung sieht vor, daß die pflanzlichen Zellen eine gesteigerte ATP-Citratlyase-Aktivität im Cytosol aufweisen.

Eine derartige Steigerung kann eine verstärkte Bildung cytosolischen Acetyl-CoAs zur Folge haben, welches zur verstärkten Synthese von Isopentenylpyrophosphat (IPP) und somit zur verstärkten Bildung von Terpenoiden führen kann.

Die oben beschriebenen transgenen Pflanzenzellen weisen aufgrund der beschriebenen veränderten Enzymaktivitäten eine im Vergleich zu Wildtyp-Zellen veränderte Fähigkeit zur Bildung und Verwertung von Acetyl-CoA auf. Diese kann z.B. durch die

Bestimmung der veränderten Mengen oder Verhältnisse an Stoffwechselendprodukten und Stoffwechselintermediaten, wie in den Beispielen beschrieben, festgestellt werden. Insbesondere können erfindungsgemäße Pflanzenzellen hergestellt werden, die veränderte Mengen an Isoprenoiden, Steroiden, Pigmenten, Isoprenoiden, Flavonoiden, Hormonen, Fetten, Ölen, Proteinen, Gummistoffen, Polyketiden oder Stoffen, die an der pflanzlichen Pathogenabwehr beteiligt sind, aufweisen, oder deren Gehalt an löslichen Zuckern, wie z.B. Glucose, Fructose und Saccharose, sowie an Stärke verändert ist. Derartige Zellen können wiederum vorteilhafte Ausgangsstoffe für weitere Verwendungen sein. Beispielsweise können diese Zellen zur heterologen Expression weiterer Gene mit dem Ziel der verstärkten Synthese von wirtschaftlich relevanten Substanzen dienen. So können etwa DNA-Sequenzen eingeführt werden, die die Enzyme zur Synthese von Polyhydroxyalkansäuren (z.B. PHB und PHA) codieren. Auf diese Weise kann das verstärkt gebildete Acetyl-CoA zur Synthese derartiger Säuren, die eine große wirtschaftliche Bedeutung haben, in Pflanzen genutzt werden. Andere Beispiele wirtschaftlich interessanter Substanzen sind Polyketide, Aromastoffe, Kautschuk, Alkaloide, Isoprenoide etc.

Von besonderer Bedeutung ist die Möglichkeit, durch Expression einer Acetyl-CoA-Hydrolase in ölspeichernden Geweben einer Pflanze, wie z.B. dem Endosperm oder den Cotyledonen von Samen oder in anderen ölspeichernden Organen, den Fluß der in den Samen bzw. Organen abgelieferten Photoassimilate in Richtung der Bildung von Zuckern, Stärke, Fetten, Pigmenten, Isoprenoiden, Polyketiden, Steroiden, Flavonoiden, Gummistoffen, Stoffen, die an der pflanzlichen Pathogenabwehr beteiligt sind, Proteinen, und Polymeren wie Polyhydroxyalkansäuren (vgl. z.B. Poirier et al., Bio/Technology 13 (1995), 142-150) zu lenken. Generelle Vorteile der erfindungsgemäßen Zellen bestehen in der Möglichkeit, Einfluß auf die Partitionierung von Stoffwechselmetaboliten, insbesondere von Acetyl-CoA, auf den Gehalt an Stoffwechselendprodukten, wie z.B. Stärke und Fette, den Gehalt und die Zusammen-

setzung sekundärer Stoffwechselmetaboliten, den Energiehaushalt und auf den Gehalt und die Zusammensetzung von Aminosäuren in den Zellen zu nehmen.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung sind die transgenen Pflanzenzellen Zellen ölspeichernder Gewebe, z.B. des Endosperms oder der Cotyledonen von Samen oder anderer ölspeichernder Organe. Bevorzugt weisen derartige Zellen im Vergleich zu entsprechenden Zellen aus nichttransformierten Pflanzen einen um mindestens 3%, vorzugsweise um mindestens 5% und besonders bevorzugt um mindestens 7% höheren Gehalt an Fetten auf.

Die Steigerung der Acetyl-CoA-Hydrolaseaktivität in den erfindungsgemäßen Zellen erfolgt vorzugsweise durch die Einführung und Expression von DNA-Sequenzen, die eine Acetyl-CoA-Hydrolase codieren. Diese DNA-Sequenzen, die ein Protein mit der enzymatischen Aktivität einer Acetyl-CoA-Hydrolase codieren, können sowohl prokaryontische, insbesondere bakterielle, als auch eukaryontische DNA-Sequenzen sein, d.h. DNA-Sequenzen aus Pflanzen, Algen, Pilzen oder tierischen Organismen bzw. Sequenzen, die Acetyl-CoA-Hydrolasen aus solchen Organismen codieren.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung handelt es sich bei den DNA-Sequenzen, die eine Acetyl-CoA-Hydrolase codieren, um Sequenzen, die Enzyme codieren, die im Vergleich zu normalerweise in pflanzlichen Zellen vorkommenden Acetyl-CoA-Hydrolasen dereguliert oder unreguliert sind. Dereguliert bedeutet dabei, daß diese Enzyme nicht in der gleichen Weise reguliert werden, wie die in nicht-modifizierten Pflanzenzellen normalerweise gebildeten Acetyl-CoA-Hydrolase-Enzyme. Insbesondere unterliegen diese Enzyme anderen Regulationsmechanismen, d.h. sie werden nicht in demselben Ausmaß durch die in den Pflanzenzellen vorhandenen Inhibitoren inhibiert bzw. durch Metaboliten allosterisch reguliert. Dereguliert bedeutet dabei vorzugsweise,

daß die Enzyme eine höhere Aktivität als endogen in Pflanzenzellen exprimierte Acetyl-CoA-Hydrolasen aufweisen. Unreguliert bedeutet im Rahmen dieser Erfindung, daß die Enzyme in pflanzlichen Zellen keiner Regulation unterliegen.

Bei diesen durch die Sequenzen codierten Enzyme kann es sich sowohl um bekannte in der Natur vorkommende Enzyme handeln, die eine abweichende Regulation durch verschiedene Substanzen aufweisen als auch um Enzyme, die durch Mutagenese von DNA-Sequenzen, die bekannte Enzyme aus Bakterien, Algen, Pilzen, Tieren oder Pflanzen codieren, hergestellt wurden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung codieren die verwendeten DNA-Sequenzen Proteine mit der enzymatischen Aktivität einer Acetyl-CoA-Hydrolase aus Pilzen, insbesondere aus Pilzen der Gattung *Saccharomyces*. Bevorzugt werden DNA-Sequenzen verwendet, die eine Acetyl-CoA-Hydrolase aus *Saccharomyces cerevisiae* codieren. Solche Sequenzen sind bekannt und beschrieben (vgl. Lee et al., Journal of Biological Chemistry 265 (1990), 7413-7418 (Zugriffsnummer M31036)). Um die Lokalisation der Acetyl-CoA-Hydrolase in Mitochondrien der pflanzlichen Zellen sicherzustellen, müssen DNA-Sequenzen, die Mitochondrien-Targeting-Sequenzen codieren, mit der codierenden Region der Acetyl-CoA-Hydrolase fusioniert werden. Solche Sequenzen sind bekannt, beispielsweise aus Braun et al. (EMBO J. 11 (1992), 3219-3227).

Bekannt sind neben der genannten DNA-Sequenz aus *Saccharomyces cerevisiae* auch weitere DNA-Sequenzen, die Proteine mit der enzymatischen Aktivität einer Acetyl-CoA-Hydrolase codieren, beispielsweise aus *Neurospora crassa* (vgl. EMBL Zugriffsnummer M31521; Marathe et al., Molecular and Cellular Biology 10 (1990), 2638-2644) und die aufgrund ihrer Eigenschaften ebenfalls zur Herstellung der erfindungsgemäßen Pflanzenzellen verwendet werden können. Dabei muß darauf geachtet werden, daß das Protein in Mitochondrien oder im Cytosol der pflanzlichen Zelle gebildet wird. Techniken zur Modifikation derartiger DNA-Sequenzen, um die Lokalisierung

der synthetisierten Enzyme in Mitochondrien und im Cytosol der pflanzlichen Zellen sicherzustellen, sind dem Fachmann bekannt. Für den Fall, daß die Acetyl-CoA-Hydrolasen Sequenzen enthalten, die zur Sekretion oder für eine bestimmte subzelluläre Lokalisation notwendig sind, z.B. zur Lokalisierung im extrazellulären Raum oder der Vakuole, müssen die entsprechenden DNA-Sequenzen deletiert werden. Weiterhin können DNA-Sequenzen, die eine Acetyl-CoA-Hydrolase codieren, unter Zuhilfenahme der bereits bekannten oben genannten DNA-Sequenzen aus beliebigen Organismen isoliert werden. Methoden für die Isolierung und Identifizierung derartiger DNA-Sequenzen sind dem Fachmann geläufig, beispielsweise die Hybridisierung mit bekannten Sequenzen oder durch Polymerase-Kettenreaktion unter Verwendung von Primern, die von bekannten Sequenzen abgeleitet sind.

Die von den identifizierten DNA-Sequenzen codierten Enzyme werden anschließend hinsichtlich ihrer Enzymaktivität und Regulation untersucht.

Durch Einführung von Mutationen und Modifikationen nach dem Fachmann bekannten Techniken, können die durch die DNA-Sequenzen codierten Proteine weiter in ihren regulatorischen Eigenschaften verändert werden, um im Vergleich zu natürlicherweise in Pflanzen vorkommenden Acetyl-CoA-Hydrolasen de- oder unregulierte Enzyme zu erhalten.

Die Steigerung der Acetyl-CoA-Synthase-, Citratsynthase-, bzw. ATP-Citratlyaseaktivität in den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen wird vorzugsweise durch die Einführung und Expression von DNA-Sequenzen erreicht, die derartige Enzyme codieren. Bei diesen Sequenzen kann es sich um Sequenzen handeln, die derartige Enzyme aus prokaryontischen, insbesondere bakteriellen, oder aus eukaryontischen Organismen, z.B. Pflanzen, Algen, Pilzen oder Tieren, codieren.

In einer bevorzugten Ausführungsform sind derartige Enzyme deregulierte oder unregulierte Enzymen, wie oben im Zusammenhang mit der Acetyl-CoA-Hydrolase erläutert.

Bei diesen durch die Sequenzen codierte Enzyme kann es sich sowohl um bekannte in der Natur vorkommende Enzyme handeln, die eine abweichende Regulation durch verschiedene Substanzen aufweisen, als auch um Enzyme, die durch Mutagenese von DNA-Sequenzen, die bekannte Enzyme aus Bakterien, Algen, Pilzen, Tieren oder Pflanzen codieren, hergestellt wurden.

DNA-Sequenzen, die Acetyl-CoA-Synthasen aus verschiedenen Organismen codieren, sind beschrieben. Bei tierischen Organismen sind z.B. solche aus *Macropus engonii*, Mensch, *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* bekannt (siehe z.B. GenEMBL-Datenbank Zugriffsnummern L15560, D16350, Z66495 und Z46786).

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung codieren die DNA-Sequenzen eine Acetyl-CoA-Synthetase mit den biologischen Eigenschaften einer Acetyl-CoA-Synthase aus Pilzen, insbesondere aus solchen der Gattung *Saccharomyces*, und besonders bevorzugt aus *Saccharomyces cerevisiae*. Derartige Sequenzen sind beispielsweise zugänglich unter den GenEMBL-Datenbank Zugriffsnummern Z47725, M94729, L09598, X56211 für *Saccharomyces cerevisiae* insbesondere unter X76891. Möglich ist auch die Verwendung von DNA-Sequenzen, die bakterielle Acetyl-CoA-Synthetasen codieren. Solche sind z.B. zugänglich unter den Zugriffsnummern M97217, M87509 oder M63968.

DNA-Sequenzen, die eine Citratsynthase codieren, sind aus verschiedenen Organismen bekannt. Sequenzen, die pflanzliche Citratsynthasen codieren, sind z.B. bekannt für *Arabidopsis thaliana* (GenEMBL-Datenbank Zugriffsnummer X17528; Unger et al., Plant Mol. Biol. 13 (1989), 411-418), sowie für Tabak, Kartoffel und Zuckerrübe (siehe WO 95/24487). Ferner sind Sequenzen bekannt, die tierische Citratsynthasen codieren, z.B. vom Schwein (Zugriffsnummer M21197, Evans et al., Biochemistry 27 (1988), 4680-4686). Vorzugsweise werden Sequenzen verwendet, die eine Citratsynthase mit den biologischen

Eigenschaften einer Citratsynthase aus Bakterien, insbesondere *E. coli*, oder Pilzen, insbesondere *Saccharomyces cerevisiae*, codieren. Verschiedene Sequenzen, die Citratsynthasen aus Bakterien codieren, sind z.B. verfügbar unter den GenEMBL-Datenbank-Zugriffsnummern: M33037, Z70021, M74818, Z70017, Z70009, Z70016, L38987, Z70014, Z70022, Z70019, Z70018, Z70020, Z70012, Z70010, Z70011, Z70013, Z70015, M36338, L33409, X66112, X60513, Z73101, M29728, M17149, L41815, Z34516, M73535, L14780, X55282, L75931 und D90117. Eine bevorzugt verwendete Sequenz ist die in Ner et al. (Biochemistry 22 (1983), 5243-5249) veröffentlichte, die eine Citratsynthase aus *E. coli* codiert. Sequenzen, die Citratsynthasen aus *E. coli* codieren, sind beispielsweise zugänglich unter den Zugriffsnummern M28987 und M28988 (siehe auch Wilde et al., J. Gen Microbiol. 132 (1986), 3239-3251). Sequenzen, die Citratsynthasen aus Pilzen codieren, sind zugänglich unter den Zugriffsnummern D63376 und D69731, solche aus *S. cerevisiae* insbesondere unter den Zugriffsnummern Z11113, Z48951, Z71255, M54982, X88846 und X00782. Letztere wird bevorzugt verwendet.

DNA-Sequenzen, die eine ATP-Citratlyase codieren, sind beispielsweise bekannt aus Ratte (Elshourbagy et al., J. Biol. Chem. 265 (1990), 1430-1435), Mensch (Elshourbagy et al., Eur. J. Biochem. 204 (1992), 491-499), *C. elegans* (Wilson et al., Nature 368 (1994), 32-38) und *Arabidopsis thaliana* (EMBL Zugriffsnummern T13771, Z18045, Z25661 und Z26232).

Für die Lokalisation des jeweiligen Enzyms in dem gewünschten Kompartiment der pflanzlichen Zelle gilt wiederum das, was bereits oben im Zusammenhang mit der Acetyl-CoA-Hydrolase gesagt worden ist.

Die Verringerung der Aktivität der Citratsynthase bzw. der ATP-Citratlyase in den erfindungsgemäßen Zellen kann mittels dem Fachmann bekannten Methoden erfolgen, z.B. durch Expres-

sion einer antisense-RNA, eines spezifischen Ribozyms oder mittels eines Cosuppressionseffektes.

Um die Expression der DNA-Sequenzen, die die oben beschriebenen Enzyme codieren, in pflanzlichen Zellen zu gewährleisten, können diese im Prinzip unter die Kontrolle eines beliebigen in pflanzlichen Zellen funktionalen Promotors gestellt werden. Die Expression der besagten DNA-Sequenzen kann generell in jedem Gewebe einer aus einer transformierten erfindungsgemäßen Pflanzenzelle regenerierten Pflanze und zu jedem Zeitpunkt stattfinden, bevorzugt jedoch findet sie in solchen Geweben statt, in denen eine veränderte Fähigkeit zur Bildung und Verwertung von Acetyl-CoA von Vorteil entweder für das Wachstum der Pflanze oder für die Bildung von Inhaltsstoffen innerhalb der Pflanze ist. Geeignet erscheinen von daher vor allem Promotoren, die eine spezifische Expression in einem bestimmten Gewebe, zu einem bestimmten Entwicklungszeitpunkt der Pflanze oder aber in einem bestimmten Organ der Pflanze sicherstellen. Vorzugsweise stehen die DNA-Sequenzen unter der Kontrolle von Promotoren, die eine samenspezifische Expression gewährleisten. Im Fall von Stärke-speichernden Pflanzen, wie z.B. von Mais, Weizen, Gerste oder anderen Getreiden wird dadurch in den Samen die Fähigkeit zur Bildung und Verwertung von Acetyl-CoA verändert, und es findet eine veränderte Synthese von Sameninhaltsstoffen statt.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden für die Steigerung der Fettsäurebiosynthese infolge eines erhöhten Acetyl-CoA-Gehaltes in Samen von ölbildenden Pflanzen wie Raps, Sojabohne, Sonnenblume und Ölpalmen Promotoren verwendet, die spezifisch im Endosperm oder aber in den Cotyledonen von sich bildenden Samen aktiv sind, wie z.B. der Phaseolin-Promotor aus *Phaseolus vulgaris*, der USP-Promotor aus *Vicia faba* oder der HMG-Promotor aus Weizen.

Erfindungsgemäß ist es ferner vorteilhaft, zur Expression der DNA-Sequenzen Promotoren zu verwenden, die in Speicher-

organen wie Knollen oder Wurzeln aktiv sind, z.B. in der Speicherwurzel der Zuckerrübe oder aber in der Knolle der Kartoffel. In diesem Fall kommt es beispielsweise bei der Expression der DNA-Sequenzen, die eine Acetyl-CoA-Hydrolase codieren, zu einer Umlenkung von Biosynthesewegen im Sinne der Bildung von mehr Zucker bzw. Stärke und einer veränderten Bildung und Verwertung von Acetyl-CoA in Richtung der Fettsäurebiosynthese.

Ferner kann die Expression der DNA-Sequenzen unter der Kontrolle von Promotoren erfolgen, die spezifisch zum Zeitpunkt der Blühinduktion, oder bei der Blütenbildung aktiviert werden, oder die aktiv sind in Geweben, die für die Blühinduktion notwendig sind. Ebenso können Promotoren verwendet werden, die zu einem nur durch äußere Einflüsse kontrollierten Zeitpunkt aktiviert werden, z.B. durch Licht, Temperatur, chemische Substanzen (s. beispielsweise WO 93/07279). Für die Erhöhung der Exportrate von Photoassimilaten aus dem Blatt sind z.B. Promotoren von Interesse, die eine Geleitzellen-spezifische Expression aufweisen. Solche Promotoren sind bekannt (z.B. der Promotor des *rolC*-Gens aus *Agrobacterium rhizogenes*).

Die DNA-Sequenzen, die die oben beschriebenen Enzyme codieren, sind vorzugsweise außer mit einem Promotor mit DNA-Sequenzen verknüpft, die eine weitere Steigerung der Transkription gewährleisten, beispielsweise sogenannte Enhancer-Elemente, oder mit DNA-Sequenzen, die im transkribierten Bereich liegen und die eine effizientere Translation der synthetisierten RNA in das entsprechende Protein gewährleisten. Derartige Regionen können von viralen Genen oder geeigneten pflanzlichen Genen gewonnen oder synthetisch hergestellt werden. Sie können homolog oder heterolog zum verwendeten Promotor sein. Vorteilhafterweise werden die codierenden DNA-Sequenzen ferner mit 3'-nicht-translatierten DNA-Sequenzen verknüpft, die die Termination der Transkription und die Polyadenylierung des Transkriptes gewährleisten. Derartige Sequenzen sind bekannt und beschrieben, beispielsweise

die des Octopinsynthasegens aus *Agrobacterium tumefaciens*. Diese Sequenzen sind beliebig gegeneinander austauschbar.

Die DNA-Sequenzen, die erfindungsgemäß in pflanzliche Zellen eingeführt und exprimiert werden, liegen in den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen vorzugsweise stabil ins Genom integriert vor. Neben den wie oben beschriebenen veränderten Enzymaktivitäten können die erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen von nicht-transformierten Pflanzenzellen ferner dadurch unterschieden werden, daß sie stabil im Genom integriert eine Fremd-DNA aufweisen, dessen Expression die Veränderung der Acetyl-CoA-Hydrolaseaktivität und gegebenenfalls einer weiteren der oben beschriebenen Enzymaktivitäten bewirkt. Fremd-DNA bedeutet dabei in diesem Zusammenhang, daß die DNA entweder in bezug auf die transformierte Pflanzenspezies heterolog ist, oder die DNA, wenn sie homolog zu dieser ist, an einem Ort im Genom lokalisiert ist, an dem sie in nicht-transformierten Zellen nicht vorkommt. Das bedeutet, daß die DNA in einer genomischen Umgebung liegt, in der sie natürlicherweise nicht vorkommt. Ferner weist die Fremd-DNA in der Regel das Charakteristikum auf, daß sie rekombinant ist, d.h. aus mehreren Bestandteilen besteht, die in dieser Kombination in der Natur nicht vorkommen.

Bei den erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen kann es sich grundsätzlich um Zellen jeder beliebigen Pflanzenspezies handeln. Von Interesse sind sowohl Zellen monocotyler als auch dicotyler Pflanzenspezies, insbesondere Zellen stärke-speichernder oder landwirtschaftlicher Nutzpflanzen, wie z.B. Roggen, Hafer, Gerste, Weizen, Kartoffel, Mais, Reis, Erbse, Zuckerrübe, Tabak, Baumwolle, Wein, Tomate usw. oder Zellen von Zierpflanzen.

In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich um Pflanzenzellen ölspeichernder Nutzpflanzen, wie z.B. Raps, Sonnenblume, Ölpalme oder Sojabohne. Besonders bevorzugt ist dabei Raps.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind ferner transgene Pflanzen, die erfindungsgemäße transgene Pflanzenzellen enthalten. Derartige Pflanzen können beispielsweise hergestellt werden durch Regeneration aus erfindungsgemäßen Pflanzenzellen nach dem Fachmann bekannten Methoden.

Pflanzen, die erfindungsgemäße Zellen enthalten, weisen vorzugsweise mindestens eines der folgenden Merkmale auf:

- (a) einen verringerten oder gesteigerten Gehalt an Fettsäuren im Blattgewebe oder im Samengewebe im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen;
- (b) einen erhöhten Gehalt an löslichen Zuckern im Blattgewebe im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen;
- (c) einen erhöhten Gehalt an Stärke im Blattgewebe im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen;
- (d) verringertes Wachstum;
- (e) Bildung von zwei oder mehr Sprossen;
- (f) Veränderung der Blattfärbung.

Gegenstand der Erfindung ist ferner Vermehrungsmaterial erfindungsgemäßer Pflanzen, das erfindungsgemäße Zellen enthält. Hierzu zählen beispielsweise Stecklinge, Samen Früchte, Wurzelstöcke, Knollen, Sämlinge etc.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind ebenfalls rekombinante DNA-Moleküle, die folgende Elemente enthalten:

- (a) einen in pflanzlichen Zellen funktionalen Promoter, und
- (b) eine DNA-Sequenz, die ein Protein mit der enzymatischen Aktivität einer Acetyl-CoA-Hydrolase codiert, und die so mit dem Promotor verknüpft ist, daß sie in pflanzlichen Zellen in eine translatierbare RNA transkribiert werden kann.

Der Transfer der DNA-Moleküle, die DNA-Sequenzen enthalten, die eines der oben beschriebenen Enzyme codieren, erfolgt nach dem Fachmann bekannten Methoden, vorzugsweise unter Verwendung von Plasmiden, insbesondere solchen Plasmiden,

die eine stabile Integration des DNA-Moleküls in das Genom transformierter Pflanzenzellen gewährleisten, beispielsweise binären Plasmiden oder Ti-Plasmiden des *Agrobacterium tumefaciens*-Systems. Neben dem *Agrobacterium*-System kommen andere Systeme zur Einführung von DNA-Molekülen in pflanzliche Zellen in Frage, wie z.B. das sogenannte biolistische Verfahren oder aber die Transformation von Protoplasten (vgl. Willmitzer L. (1993), Transgenic Plants, Biotechnology 2; 627-659 für eine Übersicht). Verfahren zur Transformation monocotyler und dicotyler Pflanzen sind in der Literatur beschrieben und sind dem Fachmann bekannt.

Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von DNA-Sequenzen, die ein Protein mit der enzymatischen Aktivität einer Acetyl-CoA-Hydrolase codieren, zur Expression in pflanzlichen Zellen, um die Acetyl-CoA-Hydrolaseaktivität in pflanzlichen Zellen zu erhöhen. Insbesondere betrifft die Erfindung die Verwendung derartiger DNA-Sequenzen zur Herstellung transgener Pflanzenzellen, die im Vergleich zu nicht-transformierten Pflanzenzellen eine veränderte Fähigkeit zur Bildung von Zuckern, Stärke, Fetten, Pigmenten, Isoprenoiden, Polyketiden, Steroiden, Flavonoiden, Gummistoffen, Stoffen, die an der pflanzlichen Pathogenabwehr beteiligt sind, Proteinen, und/oder Polymeren wie Polyhydroxyalkansäuren aufweisen. Die Erhöhung der Acetyl-CoA-Hydrolaseaktivität erfolgt dabei vorzugsweise in den Mitochondrien oder in dem Cytosol der pflanzlichen Zellen.

Fig. 1 zeigt eine schematische Abbildung des 14,39 kb großen Plasmids Bin-mHy-Int. Das Plasmid enthält folgende Fragmente:

- A = Fragment A (528 bp) enthält das EcoRI - Asp718 Fragment der Promotorregion des 35S Promotors des "Cauliflower Mosaic Virus" (Nucleotide 6909 bis 7437) (Frank et al., Cell 21 (1980), 285-294).
- B = Fragment b (109 bp) umfaßt ein DNA-Fragment mit der Codierregion der mitochondriale Targetsequenz des

Proteins der Matrix processing peptidase (MPP) aus Kartoffel (Braun et al., EMBO J. 11 (1992), 3219-3227 (Zugriffsnummer X66284)).

- C = Fragment C (189 bp) umfaßt ein DNA-Fragment des Introns PIV2 aus dem Plasmid p35S GUS INT (Vancanneyt et al., Mol. Gen. Genet. 220 (1990), 245-250).
- D' = Fragment D' (170 bp) umfaßt ein DNA-Fragment mit dem 5'-Bereich der Codierregion des Acetyl-CoA-Hydrolase-Gens (Lee et al., Journal of Biological Chemistry 265 (1990), 7413-7418), Nucleotide 614 bis 784 (Zugriffsnummer M31036).
- D'' = Fragment D'' (1420 bp) umfaßt ein DNA-Fragment mit der Codierregion des Acetyl-CoA-Hydrolase-Gens (Lee et al., Journal of Biological Chemistry 265 (1990), 7413-7418), Nucleotide 785 bis 2194 (Zugriffsnummer M31036).
- E = Fragment E (192 bp) umfaßt das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmides pTi-ACH5, Nucleotide 11749-11939 (Gielen et al., EMBO J. 11 (1984), 3219-3227).

Fig. 2 zeigt eine schematische Abbildung des 14,28 kb großen Plasmids Bin-Hy-Int. Das Plasmid enthält folgende Fragmente:

- A = Fragment A (528 bp) enthält das EcoRI - Asp718 Fragment der Promotorregion des 35S Promotors des "cauliflower mosaic virus" (Nucleotide 6909 bis 7437) (Frank et al., Cell 21 (1980), 285-294).
- C = Fragment C (189 bp) umfaßt ein DNA-Fragment des Introns PIV2 aus dem Plasmid p35S GUS INT (Vancanneyt et al., Mol. Gen. Genet. 220 (1990), 245-250).
- D' = Fragment D' (170 bp) umfaßt ein DNA-Fragment mit dem 5'-Bereich der Codierregion des Acetyl-CoA-Hydrolase-Gens (Lee et al., Journal of Biological

Chemistry (1990) 265, 7413-7418), Nucleotide 614 bis 784 (Zugriffsnummer M31036).

D'' = Fragment D'' (1420 bp) umfaßt ein DNA-Fragment mit der Codierregion der Acetyl-CoA-Hydrolase-Gens (Lee et al., Journal of Biological Chemistry (1990) 265, 7413-7418), Nucleotide 785 bis 2194 (Zugriffsnummer M31036).

E = Fragment E (192 bp) umfaßt das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmides pTi-ACH5, Nucleotide 11749-11939 (Gielen et al., EMBO J. 11 (1984), 3219-3227).

Fig. 3 zeigt einen Western-Blot zum Nachweis der Expression der Acetyl-CoA-Hydrolase aus *Saccharomyces cerevisiae* in transgenen Tabakblättern.

Fig. 4 zeigt drei transgene MB-Hyl-Linien im Vergleich zu einer Kontrollpflanze (links).

Fig. 5 zeigt Blätter der transgenen MB-Hyl-Linien 39

Fig. 6 zeigt Blätter einer Kontrollpflanze

Fig. 7 zeigt eine Pflanze einer transgenen MB-Hyl Linie mit Blüten

Fig. 8 zeigt eine Kontrollpflanze mit Blüten

Fig. 9 zeigt eine schematische Abbildung des 14, 25 kb großen Plasmids pTCSAS

A = Fragment A (528 bp) enthält das EcoRI - Asp718 Fragment der Promotorregion des 35S Promotors des "Cauliflower Mosaic Virus" (Nucleotide 6909 bis 7437) (Frank et al., Cell 21 (1980), 285-294).

B = Fragment B (1747 bp) umfaßt ein DNA-Fragment mit der Codierregion des Citrat-Synthase-Gens aus Tabak in

reverser Orientierung (Nucleotide 1 bis 1747)
(Zugriffsnummer X84226).

C = Fragment C (192 bp) umfaßt das Polyadenylierungs-
signal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmides pTi-
ACH5, Nucleotide 11749-11939 (Gielen et al., EMBO J.
11 (1984), 3219-3227).

Methoden

1. Clonierungsverfahren

Zur Clonierung in *E. coli* wurden die Vektoren pUC9-2, pA7 (von Schaewen, A. (1989) Dissertation, Freie Universität Berlin) und pAM (siehe Beispiel 1) verwendet. Für die Pflanzentransformation wurden die Genkonstruktionen in den binären Vektor pBinAR-Hyg (Hinterlegungsnummer: DSM 9505; Hinterlegungsdatum: 20.10.1994) cloniert.

2. Bakterienstämme

Für die pUC-Vektoren und für die pBinARHyg-Konstrukte wurde der *E. coli*-Stamm DH5 α (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburgh, USA) verwendet.

Die Transformation der Plasmide in die Kartoffelpflanzen wurde mit Hilfe des *Agrobacterium tumefaciens*-Stammes C58C1 pGV2260 durchgeführt (Deblaere et al., Nucl. Acids Res. 13 (1985), 4777-4788).

3. Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Der Transfer der DNA erfolgte durch direkte Transformation nach der Methode von Höfgen und Willmitzer (Nucleic Acids Res. 16 (1988), 9877). Die Plasmid-DNA transformierter Agrobakterien wurde nach der Methode von Birnboim und Doly (Nucleic Acids Res. 7 (1979), 1513-1523)

isoliert und nach geeigneter Restriktionsspaltung gelelektrophoretisch analysiert.

4. Transformation von Tabak bzw. Raps

Die Transformation von Tabak erfolgte nach der in Rosahl et al. (EMBO J. 6 (1987), 1155-1159) beschriebenen Methode.

Die Transformation von Raps (*Brassica napus*) erfolgte analog zu der in Bade und Damm in "Gene Transfer to Plants" (Springer Verlag Heidelberg (1995), S. 30-38) beschriebenen Methode.

5. Transformation von Kartoffeln

Zehn kleine mit dem Skalpell verwundete Blätter einer Kartoffel-Sterilkultur (*Solanum tuberosum* L. cv. Désirée) wurden in 10 ml MS-Medium (Murashige und Skoog, *Physiol. Plant* 15 (1962), 473) mit 2 % Saccharose gelegt, welches 50 µl einer unter Selektion gewachsenen *Agrobacterium tumefaciens*-Übernachtskultur enthielt. Nach 3-5-minütigem leichtem Schütteln erfolgte eine weitere Inkubation für 2 Tage im Dunkeln. Daraufhin wurden die Blätter zur Kallusinduktion auf MS-Medium mit 1,6 % Glucose, 5 mg/l Naphthylelessigsäure, 0,2 mg/l Benzylaminopurin, 250 mg/l Claforan, 3 mg/l Hygromycin und 0,80 % Bacto Agar gelegt. Nach einwöchiger Inkubation bei 25°C und 3000 Lux wurden die Blätter zur Sproßinduktion auf MS-Medium mit 1,6 % Glucose, 1,4 mg/l Zeatinribose, 20 mg/l Naphthylelessigsäure, 20 mg/l Giberellinsäure, 250 mg/l Claforan, 3 mg/l Hygromycin und 0,80 % Bacto Agar gelegt.

6. Pflanzenhaltung

Kartoffelpflanzen wurden im Gewächshaus unter folgenden Bedingungen gehalten:

- Lichtperiode 16 h bei 25000 Lux und 22°C
- Dunkelperiode 8 h bei 15°C
- Luftfeuchte 60 %.

Tabakpflanzen wurden im Gewächshaus unter folgenden Bedingungen gehalten:

- Lichtperiode 14 h bei 10000 Lux und 25°C
- Dunkelperiode 10 h bei 20°C
- Luftfeuchte 65 %.

7. Bestimmung der Acetyl-CoA-Hydrolase-Aktivität in Blättern von Tabak- und Kartoffelpflanzen

Zur Bestimmung der Acetyl-CoA-Hydrolase-Aktivität in Tabak- und Kartoffelblättern wurden Blattproben in Extraktionspuffer (50 mM Hepes-KOH pH 7,5; 5 mM MgCl₂; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 10 mM DTT; 10 % (Vol./Vol.) Glycerin; 0,1 % (Vol./Vol.) Triton X-100) homogenisiert. Nach Zentrifugation wurden die zellfreien Extrakte für die Enzymaktivitätsmessung eingesetzt.

Reaktionspuffer: 100 mM Na-Phosphat, pH 7.2
[1-¹⁴C]Acetyl-CoA 0.5 µCi / 100 µl
Reaktionsvolumen: 105 µl
Reaktionstemperatur: 30°C
Messzeitpunkte: 2, 4, 6, 10 min

Prinzip:

Es werden DE81-Filter (Ionenaustauscher) verwendet, wobei HSCoA und [1-¹⁴C]Acetyl-CoA binden, jedoch [1-¹⁴C]Acetat beim Waschen (2 mal 5 min) der Filter mit 2% Essigsäure eluiert wird. Zur Bestimmung der Acetyl-CoA-

Hydrolase-Aktivität wurde die auf den Filtern verbliebene Radioaktivität durch Szintillationsmessung und Vergleich mit Eichkurven bestimmt.

(vgl. Roughan, P.G. et al., Analytical Biochemistry. 216 (1994), 77-82)

8. Western-Blot-Analyse zum Nachweis der Expression von Acetyl-CoA-Hydrolase in Blättern

Zum Nachweis der Acetyl-CoA-Hydrolase in Tabak- und Kartoffelblättern wurden Blattproben in Extraktionspuffer (50 mM Hepes-KOH pH 7,5; 5 mM MgCl₂; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 10 mM DTT; 10 % (Vol./Vol.) Glycerin; 0,1 % (Vol./Vol.) Triton X-100) homogenisiert. Nach Zentrifugation wurden Aliquots (10 µg Protein) der zellfreien Extrakte für einen Western-Blot eingesetzt. Western-Blot-Analysen wurden unter Verwendung eines gegen die Acetyl-CoA-Hydrolase aus *Saccharomyces cerevisiae* gerichteten polyclonalen Antikörpers wie bei Landschütze et al. (EMBO J. 14 (1995), 660-666) beschrieben durchgeführt.

9. Bestimmung von Stoffwechselintermediaten in Tabakblättern

Die Bestimmung von Saccharose, Glucose, Fructose und Stärke erfolgte spektrophotometrisch mittels gekoppelter enzymatischer Reaktionen nach Stitt et al. (Methods in Enzymology, 174, 518-552).

a) Bestimmung von Saccharose, Glucose und Fructose

Jeweils drei Blattscheiben mit einem Durchmesser von je 1,1 cm wurden mit je 500 µl 80% Ethanol in Wasser über 90 min bei 70°C extrahiert. Nach Trennung der festen von der flüssigen Phase durch Zentrifugation, wurde die flüssige Phase abgenommen und zur Messung der löslichen Zucker eingesetzt.

Der Reaktionspuffer enthielt:

100 mM Imidazol pH 6,9;

5 mM $MgCl_2$;

2 mM NADP

1 mM ATP

2 U/ml Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase

G6P-Bestimmung: + 1,4 U/ml Hexokinase

F1P-Bestimmung: + 1,4 U/ml Phosphoglucoisomerase

G1P-Bestimmung: + 2,0 U/ml Phosphoglucomutase

Die Messung erfolgt bei 30°C mit 50 μ l Extrakt.

(G6P = Glucose-6-Phosphat; F1P = Fructose-1-Phosphat;

G1P = Glucose-1-Phosphat)

b) Bestimmung von Stärke

Jeweils drei Blattscheiben mit einem Durchmesser von je 1,1 cm wurden mit je 500 μ l 80% Ethanol in Wasser über 90 min bei 70°C extrahiert. Nach Trennung der festen von der flüssigen Phase durch Zentrifugation, wurde die flüssige Phase abgenommen, der feste Rückstand wurde zwei Mal mit 80% Ethanol in Wasser gewaschen.

Das Pellet wurde mit 400 μ l 0,2 N NaOH bei 95°C über eine Stunde aufgeschlossen. Es wurde mit 70 μ l 1 N Essigsäure bei Raumtemperatur neutralisiert und die feste von der flüssigen Phase durch Zentrifugation abgetrennt.

Die Stärke wurde unter Verwendung eines Sortiments zur Stärkebestimmung (Boehringer, Mannheim) nach Herstellerangaben mit Hilfe von Amyloglucosidase hydrolysiert und die freigesetzte Glucose enzymatisch bestimmt.

c) Bestimmung von Fettsäuren in Blättern und Samen

Blattscheiben (jeweils 1,1 cm Durchmesser) oder jeweils ein Tabaksamen wurden in 1 ml 1 N HCl in Methanol bei 80°C unter Stickstoffatmosphäre nach Zugabe von 5 μ g Meristylsäure als internem Standard für 15

Minuten in einem verschlossenen Glasgefäß erhitzt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden 1 ml 0,9 % wässrige NaCl Lösung und 1 ml n-Hexan(p.A.) zugegeben. Nach Extraktion der wässrigen Phase wurde die organische Phase abgenommen und mit gasförmigem Stickstoff eingeengt.

Die Auftrennung und Quantifizierung der Fettsäuremethylester erfolgte durch Gaschromatographie nach Browse et al. (Analytical Biochemistry 152 (1986), 141-145).

d) Bestimmung von Chlorophyll a und b, Antheraxanthin, Zeaxanthin und Violaxanthin

Blattscheiben (jeweils 1,1 cm Durchmesser) wurden direkt nach der Probennahme in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die folgenden Schritte wurden bei abgedunkeltem Raumlicht durchgeführt.

Die Proben wurden mit 250 µl eiskaltem 85 % Aceton in Wasser homogenisiert, die Suspension wurde dann ca. 30 Sekunden mit Stickstoffgas durchspült und anschließend 15 Minuten auf Eis gelagert. Nach Zentrifugation über 15 Minuten bei 4°C und 10000g wurde der Überstand durch einen Millipore-Millex-GV4 Sterilfilteraufsatz filtriert und anschließend 30 Sekunden bei 4°C mit Stickstoffgas durchspült. Die Proben wurden dann bis zur Messung bei -70°C gelagert. Die Trennung und Quantifizierung der Pigmente erfolgte durch Hochdruckflüssigkeits-chromatographie (HPLC) wie durch Zhayer und Björkman (J. Chromatogr. 543 (1990), 137-145) beschrieben.

Als Trennsäule wurde eine ZORBAX ODS 5 µm non-endcapped 250 * 4,5 mm Reversed-Phase-Säule verwendet. Die Detektion der Pigmente erfolgte durch Messung der Absorption bei 450 nm in einem Bereich von 0,04 Absorptionseinheiten (AUFS).

10. Bestimmung der Citrat-Synthase-Aktivität in Blättern von Tabakpflanzen

Zur Bestimmung der Citrat-Synthase-Aktivität in Tabakblättern wurden Blattproben in Extraktionspuffer (50 mM Hepes-KOH pH 7,5; 5 mM MgCl₂; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 10 % (Vol./Vol.) Glycerin; 0,1 % (Vol./Vol.) Triton X-100; 4 mU / ml α_2 -Macroglobulin) homogenisiert. Nach Zentrifugation wurden die zellfreien Extrakte für die Enzymaktivitätsmessung eingesetzt.

Die Aktivität der Citrat-Synthase wurde photometrisch bestimmt:

Reaktionspuffer:

0,1 M Tris-Cl pH 8.0

0,1 mM 5,5'-Dithio-bis(-2-nitrobenzoesäure)

0,3 mM Acetyl-CoA

Reaktionsvolumen: 700 μ l

Reaktionstemperatur: 30°C

eingesetztes Protein: ~ 60 μ g

Start: 7 μ l 50 mM Oxalacetat

Die Messung der Absorption erfolgte bei 412 nm.

Die Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1

Konstruktion des binären Plasmides Bin-mHy-Int

Für die Pflanzentransformation wurde die Codierregion des Acetyl-CoA-Hydrolase-Gens aus *Saccharomyces cerevisiae* mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) ausgehend von genomischer *Saccharomyces cerevisiae* DNA mittels der Primer

AcCoHy1 (5'-GTCAGGATCCATGACAATTTCTAATTTGTAAAGCAGAGA-3')

(Seq ID No. 1) und

AcCoHy2 (5'-GTCAGGATCCCTAGTCAACTGGTTCAGCTGTCGACCTT-3')

(Seq ID No. 2)

amplifiziert. Die Sequenz der Acetyl-CoA-Hydrolase aus *Saccharomyces cerevisiae* ist in der GenEmbl-Datenbank mit der Zugriffsnummer M31036 eingetragen. Die Clonierung des Acetyl-CoA-Hydrolase-Gens ist in Lee et al. (Journal of Biological Chemistry 265 (1990), 7413-7418) beschrieben. Das amplifizierte Fragment entspricht der Region von den Nucleotiden 614 bis 2194 dieser Sequenz (Zugriffsnummer M31036). Hierbei wurde am 5'-Ende und am 3'-Ende je eine BamHI-Schnittstelle eingefügt. Das 1590 bp lange BamHI geschnittene PCR Fragment wurde über die zusätzlichen Schnittstellen in die BamHI-Schnittstelle des Vektors pUC9-2 cloniert. Das Intron PIV2 (189 bp) aus dem Plasmid p35S GUS INT (Vancanneyt et al., Mol. Gen. Genet. 220 (1990), 245-250) über PCR mittels der Primer GUS-1 (5'-gtatacgtaaagtttctgcttctac-3') (Seq ID No. 3) und GUS-2 (5'-gtacagctgcacatcaacaaattttgg-3') (Seq ID No. 4) amplifiziert, mit SnaBI und PvuII nachgeschnitten und in die singuläre BbrPI-Schnittstelle des Acetyl-CoA-Hydrolase-Gens aus *Saccharomyces cerevisiae* cloniert. Die korrekte Orientierung des insertierten Introns (5'-Ende des Introns zum 3'-Ende des 5'-gelegenen Exons hin orientiert) wurde durch Sequenzanalyse bestätigt. Das auf diese Weise hergestellte Plasmid erhielt die Bezeichnung pUC-HyInt.

Das Plasmid pUC-HyInt wurde mit BamHI geschnitten und das 1779 bp lange Acetyl-CoA-Hydrolase-Fragment (mit insertiertem Intron) in die BamHI-Schnittstelle des Plasmid pAM cloniert. Das so erhaltene Plasmid erhielt die Bezeichnung pAM-HyInt.

Das Plasmid pAM wurde wie im folgenden beschrieben hergestellt. Die mitochondriale Targetsequenz (111 bp) des Proteins der "Matrix processing peptidase" (MPP) aus Kartoffel wurde unter Verwendung der Primer Mito-TP1 (5'-GATCGGTACCATGTACAGATGCGCATCGTCT-3') (Seq ID No. 5) und Mito-TP2 (5'-GTACGGATCCCTTGTTGCAACAGCAGCTGA-3') (Seq ID No. 6) mittels PCR amplifiziert. Als Matrize für die PCR diente das Plasmid pMPP (Braun et al., EMBO J. 11 (1992), 3219-3227). Das amplifizierte Fragment entspricht der Region von den

Nucleotiden 299 bis 397 der MPP cDNA (Braun et al., s.o.; EMBL Zugriffsnummer: X66284). Hierbei wurde am 5'-Ende eine Asp718-Schnittstelle und am 3'-Ende eine BamHI-Schnittstelle eingefügt. Das PCR-Fragment wurde mit Asp718 und BamHI geschnitten und das resultierende 109 bp lange Fragment anschließend in den mit Asp718 und BamHI geschnittenen Vektor pA7 (von Schaewen, A. (1989) Dissertation, Freie Universität Berlin) cloniert.

Das Plasmid pAM-HyInt wurde mit Asp718 und XbaI geschnitten und das 1887 bp lange Fragment bestehend aus der Codierregion für das Targetingpeptid der Kartoffel "Matrix processing peptidase" und der Codierregion für die Acetyl-CoA-Hydrolase aus *Saccharomyces cerevisiae* (mit insertiertem Intron) isoliert und die 5'-Überhänge dieses Fragmentes unter Verwendung der T4-DNA-Polymerase zu glatten Enden aufgefüllt. Das so hergestellte Fragment wurde in die SmaI-Schnittstelle des binären Plasmids pBinAR-Hyg cloniert. Dabei war die Codierregionen des Targetingpeptids der Kartoffel "Matrix processing peptidase" zum 35S-RNA-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus hin orientiert. Hieraus resultierte das Plasmid Bin-mHy-Int (siehe Figur 1), welches für die Transformation von Tabak (*Nicotiana tabacum* SNN) und Kartoffel (*Solanum tuberosum* L. cv. Désirée) wie oben beschrieben eingesetzt wurde.

Beispiel 2

Konstruktion des binären Plasmides Bin-Hy-Int

Das BamHI-Fragment des Plasmides pUC-Hy-Int (siehe Beispiel 1) wurde in die BamHI-Schnittstelle des Plasmides pA7 (von Schaewen, A. (1989) Dissertation, Freie Universität Berlin) cloniert. Dabei war das 5'-Ende der Codierregion der Acetyl-CoA-Hydrolase zum 35S-RNA-Promotor hin orientiert. Das so hergestellte Plasmid erhielt die Bezeichnung pA7-Hy-Int. Das Plasmid pA7-Hy-Int wurde mit KpnI und XbaI geschnitten, das 1778 bp lange Fragment bestehend aus der Codierregion für die Acetyl-CoA-Hydrolase aus *Saccharomyces cerevisiae* (mit

insertertem Intron) isoliert und anschließend in den mit KpnI und XbaI geschnittene binäre Plasmid pBinAR-Hyg (Hinterlegungsnummer: DSM 9505; Hinterlegungsdatum: 20.10.1994) cloniert. Hieraus resultierte das Plasmid Bin-Hy-Int (siehe Figur 2), welches für die Transformation von Tabak (*Nicotiana tabacum* SNN) und Kartoffel (*Solanum tuberosum* L. cv. Désirée) eingesetzt wurde.

Beispiel 3

Analyse von transgenen Tabakpflanzen, die eine Acetyl-CoA-Hydrolase aus *Saccharomyces cerevisiae* exprimieren

Aus Tabakpflanzen, die mit dem Plasmid Bin-mHy-Int (siehe Beispiel 1) transformiert worden waren, wurden ganze Tabakpflanzen regeneriert, in Erde transferiert und durch Western-Blot-Analyse auf die Anwesenheit der Acetyl-CoA-Hydrolase aus *Saccharomyces cerevisiae* hin in Blättern selektiert. Dabei wurden mehrere Genotypen identifiziert, die eindeutig die Acetyl-CoA-Hydrolase aus *Saccharomyces cerevisiae* exprimieren (siehe Fig. 3). Mehrere der selektierten transgenen Linien wurden hinsichtlich der Acetyl-CoA-Hydrolase-Aktivität in Blättern analysiert. Dabei wurde in einigen Linien eine um bis zu dreifach erhöhte spezifische Acetyl-CoA-Hydrolase-Aktivität verglichen mit den Kontrollpflanzen gemessen (z.B. MB-Hy1-39, MB-Hy1-78, MB-Hy1-81; vgl. Tabelle I).

Tabelle I

Pflanze	Acetyl-CoA-Hydrolase-Aktivität (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ Protein)
Kontrolle	1,49 ± 1,06
MB-Hy1-39	5,58 ± 1,59
MB-Hy1-78	2,92 ± 0,74
MB-Hy1-81	3,25 ± 0,79

Die hier dargestellten Enzymaktivitäten sind der Mittelwert von mindestens acht Messungen ausgehend von mindestens drei unabhängigen Pflanzen der genannten transgenen Linie.

Die oben genannten Genotypen MB-Hyl-39, MB-Hyl-78, MB-Hyl-81 wurden amplifiziert, und jeweils 3 Pflanzen wurden in ein Gewächshaus transferiert.

Überraschenderweise wurde festgestellt, daß die Blätter von Pflanzen der transgenen Linien MB-Hyl-39, MB-Hyl-78, MB-Hyl-81 reduzierte Mengen an Fettsäuren im Vergleich zu Kontrollpflanzen enthalten (vgl. Tabelle II).

Tabelle II

Fettsäuretyp	Kontrollpflanze [$\mu\text{mol/g}$ (Trockengewicht)]		MB-Hyl-39 [$\mu\text{mol/g}$ (Trockengewicht)]		MB-Hyl-78 [$\mu\text{mol/g}$ (Trockengewicht)]		MB-Hyl-81 [$\mu\text{mol/g}$ (Trockengewicht)]	
16:0	2,63	$\pm 0,35$	1,17	$\pm 0,18$	2,00	$\pm 0,34$	2,21	$\pm 0,29$
16:1	0,76	$\pm 0,10$	0,35	$\pm 0,05$	0,59	$\pm 0,05$	0,65	$\pm 0,07$
16:2	0,57	$\pm 0,10$	0,23	$\pm 0,04$	0,31	$\pm 0,02$	0,37	$\pm 0,01$
18:0	0,26	$\pm 0,06$	0,11	$\pm 0,02$	0,16	$\pm 0,03$	0,18	$\pm 0,02$
16:3	1,69	$\pm 0,17$	0,66	$\pm 0,13$	1,66	$\pm 0,18$	0,68	$\pm 0,12$
18:1	0,69	$\pm 0,13$	0,15	$\pm 0,00$	0,27	$\pm 0,07$	1,26	$\pm 0,01$
18:2	2,79	$\pm 0,27$	1,13	$\pm 0,13$	1,44	$\pm 0,13$	2,21	$\pm 0,23$
18:3	11,43	$\pm 1,46$	4,36	$\pm 0,60$	8,61	$\pm 0,94$	10,02	$\pm 0,54$
Summe:	20,83	$\pm 2,64$	8,17	$\pm 1,15$	15,03	$\pm 1,78$	17,57	$\pm 1,29$

Die angegebenen Werte stellen Mittelwerte sowie die Standardabweichungen aus jeweils 2 unabhängigen Messungen dar.

Überraschenderweise wurde ferner festgestellt, daß die Samen der transgenen Pflanzen MB-Hyl-39, MB-Hyl-78, MB-Hyl-81

gleiche Mengen an Fettsäuren im Vergleich zu Kontrollpflanzen enthalten (vgl. Tabelle III).

Tabelle III

Fettsäuretyp	Kontrollpflanze [nmol/Samen]		MB-Hy1-39 [nmol/Samen]		MB-Hy1-78 [nmol/Samen]		MB-Hy1-81 [nmol/Samen]	
16:0	12,28	±2,86	10,14	±3,90	13,55	±2,63	10,71	±1,20
16:1	0,25	±0,19	0,27	±0,17	0,42	±0,09	0,27	±0,15
16:2	0,20	±0,17	0,07	±0,11	0,09	±0,12	0,07	±0,08
18:0	0,02	±0,05	0,03	±0,06	0,00	±0,00	0,01	±0,03
16:3	3,01	±1,13	2,04	±0,86	3,46	±1,12	2,60	±0,42
18:1	13,08	±3,49	10,25	±5,02	15,00	±2,99	10,78	±1,37
18:2	101,49	±20,42	86,29	±36,05	111,58	±19,46	90,03	±8,97
18:3	1,71	±0,28	1,74	±0,60	2,06	±0,35	2,05	±0,37
Summe:	132,05	±28,59	110,84	±46,77	146,16	±10,71	116,51	±12,59

Die angegebenen Werte stellen Mittelwerte sowie die Standardabweichungen aus mindestens 6 unabhängigen Messungen dar.

Die Analyse des Gewichtes von jeweils 200 Samen ergab, daß kein signifikanter Unterschied zwischen den Samen der transgenen Pflanze MB-Hy1-39 und Samen von Kontrollpflanzen bestehen (vgl. Tabelle IV).

Tabelle IV

	Samengewicht [µg pro Samen]	
Kontrollpflanze	88,0	±6,0
MB-Hy1-39	87,8	±2,5

Die Analyse von löslichen Zuckern wie Glucose, Fructose und Saccharose ergab erstaunlicherweise, daß die Blätter von

Pflanzen der transgenen Linien MB-Hyl-39, MB-Hyl-78, MB-Hyl-81 erhöhte Gehalte an Saccharose, Glucose und Fructose sowohl am Ende der Lichtphase (vgl. Tabelle V), als auch am Ende der Dunkelpphase enthalten (vgl. Tabelle VI).

Tabelle V

Gehalte an löslichen Zuckern am Ende der Lichtphase (n=6)						
	Glucose $\mu\text{mol/g(Trocken-}$ gewicht)		Fructose $\mu\text{mol/g(Trocken-}$ gewicht)		Saccharose $\mu\text{mol/g(Trocken-}$ gewicht)	
Kontroll- pflanze	17,3	$\pm 17,5$	31,2	$\pm 20,0$	146,6	$\pm 54,5$
MB-Hyl-39	79,6	$\pm 44,8$	105,8	$\pm 61,7$	294,0	$\pm 112,7$
MB-Hyl-78	188,4	$\pm 194,2$	118,1	$\pm 129,3$	239,9	$\pm 161,1$
MB-Hyl-81	88,6	$\pm 59,0$	24,3	$\pm 39,5$	208,8	$\pm 148,8$

Die angegebenen Werte stellen Mittelwerte sowie die Standardabweichungen aus jeweils 6 unabhängigen Messungen dar.

Tabelle VI

Gehalte an löslichen Zuckern am Ende der Dunkelpphase (n=3)						
	Glucose $\mu\text{mol/g(Trocken-}$ gewicht)		Fructose $\mu\text{mol/g(Trocken-}$ gewicht)		Saccharose $\mu\text{mol/g(Trocken-}$ gewicht)	
Kontroll- pflanze	10,2	$\pm 9,2$	5,1	$\pm 4,4$	44,9	$\pm 13,9$
MB-Hyl-39	30,0	$\pm 18,8$	28,1	$\pm 14,8$	150,9	$\pm 112,3$
MB-Hyl-78	142,0	$\pm 150,3$	53,4	$\pm 30,2$	190,9	$\pm 200,8$
MB-Hyl-81	8,8	$\pm 7,6$	12,9	$\pm 1,9$	16,5	$\pm 2,1$

Die angegebenen Werte stellen Mittelwerte sowie die Standardabweichungen aus jeweils 3 unabhängigen Messungen dar.

Bei der Analyse von Stärke wurde weiterhin erstaunlicherweise festgestellt, daß die Blätter von Pflanzen der transgenen Linien MB-Hy1-39, MB-Hy1-78, MB-Hy1-81 erhöhte Gehalte an Stärke sowohl am Ende der Lichtphase, als auch am Ende der Dunkelphase enthalten (vgl. Tabelle VII).

Tabelle VII

Gehalte an Stärke am Ende der Lichtphase und am Ende der Dunkelphase				
	Ende der Lichtphase (n=6)		Ende der Dunkelphase (n=3)	
	mmol/g(Trockengewicht)		mmol/g(Trockengewicht)	
Kontrollpflanze	2,37	±0,67	0,97	±0,76
MB-Hy1-39	4,81	±1,82	2,57	±2,08
MB-Hy1-78	1,79	±1,49	1,77	±2,18
MB-Hy1-81	2,23	±1,33	0,17	±0,02

Die angegebenen Werte stellen Mittelwerte sowie die Standardabweichungen aus jeweils 3 bzw. 6 (vgl. Tabelle VII) unabhängigen Messungen dar.

Bei der Anzucht der transgenen Pflanzen MB-Hy1-39, MB-Hy1-78, MB-Hy1-81 im Gewächshaus wurde weiterhin festgestellt, daß die transgenen Pflanzen im Vergleich zu Kontrollpflanzen einen veränderten Phänotyp aufwiesen. Insbesondere wurde im Falle der transgenen Pflanzen ein reduziertes Wachstum, die Ausbildung mehrerer Sprosse, sowie eine mosaikartige Veränderung in der Blattfärbung festgestellt (siehe Fig. 4 und 5). Zur genaueren Analyse der Blattfärbung wurden die Gehalte an Chlorophyll a und b, sowie an den Carotinoiden

Zeaxanthin, Antheraxanthin und Violoxanthin bestimmt (vgl. Tabelle VIII und IXa und b).

Tabelle VIII

	Gehalt an Chlorophyll b ($\mu\text{mol} / \text{g}$ (Trockengewicht))		Gehalt an Chlorophyll a ($\mu\text{mol} / \text{g}$ (Trockengewicht))	
Kontroll- pflanze	5,42	$\pm 0,46$	5,98	$\pm 0,54$
MB-Hyl-39	2,38	$\pm 0,21$	2,73	$\pm 0,21$
MB-Hyl-78	4,23	$\pm 0,82$	4,81	$\pm 0,74$
MB-Hyl-81	5,13	$\pm 0,36$	6,03	$\pm 0,54$

Die angegebenen Werte stellen Mittelwerte sowie die Standardabweichungen aus jeweils 3 unabhängigen Messungen dar.

Tabelle IXa

	Violaxanthin ($\mu\text{mol} / \text{g}$ (Trockengewicht))		Antheraxanthin ($\mu\text{mol} / \text{g}$ (Trockengewicht))		Zeaxanthin ($\mu\text{mol} / \text{g}$ (Trockengewicht))	
Kontroll- pflanze	0,173	$\pm 0,042$	0,178	$\pm 0,049$	0,299	$\pm 0,114$
MB-Hyl-39	0,215	$\pm 0,045$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
MB-Hyl-78	0,314	$\pm 0,052$	0,051	$\pm 0,036$	n.d.	n.d.
MB-Hyl-81	0,591	$\pm 0,205$	0,034	$\pm 0,004$	n.d.	n.d.

n.d. nicht detektiert (unter der Nachweisgrenze)

Tabelle IXb

	Lutein ($\mu\text{mol/g}$ (Trockengewicht))		Neoxanthin ($\mu\text{mol/g}$ (Trockengewicht))	
Kontrollpflanze	1,94	$\pm 0,32$	0,38	$\pm 0,06$
MB-Hyl-39	0,74	$\pm 0,11$	0,15	$\pm 0,03$
MB-Hyl-78	1,46	$\pm 0,51$	0,22	$\pm 0,02$
MB-Hyl-81	1,79	$\pm 0,40$	0,39	$\pm 0,11$

Die angegebenen Werte stellen Mittelwerte sowie die Standardabweichungen aus jeweils 3 unabhängigen Messungen dar.

Beispiel 4

Konstruktion des binären Plasmides pTCSAS

Das durch in-vivo-Excision aus einer λ ZAP II cDNA Bibliothek aus *Nicotiana tabacum* L. erhaltene Plasmid pTCS, enthält in der EcoR I Schnittstelle des pBluescript SK Vektors ein 1747 bp cDNA Fragment mit der Codierregion des Citrat-Synthase-Gens aus Tabak (Zugriffsnummer X84226).

Das BamHI-Fragment des Plasmides pTCS wurde in die BamHI/SalI-Schnittstellen des binären Plasmides BinAR cloniert. Dabei war das 3'-Ende der Codierregion der Citrat-Synthase zum 35S-RNA-Promotor hin orientiert. Das so hergestellte Plasmid erhielt die Bezeichnung pTCSAS.

pTCSAS wurde für die Transformation von Tabak (*Nicotiana tabacum* SNN) eingesetzt.

Beispiel 5

Analyse von transgenen Tabakpflanzen mit reduzierter Citrat-Synthase-Aktivität

Regenerierte Tabakpflanzen, die mit dem Plasmid pTCSAS transformiert worden waren, wurden in Erde transferiert und durch Messung der Citrat-Synthase-Aktivität hin in Blättern selektiert. Dabei wurden mehrere Genotypen identifiziert, die eindeutig eine Reduktion der Citrat-Synthase-Aktivität (siehe Tabelle X). Mehrere der selektierten transgenen Linien wurden hinsichtlich der Citrat-Synthase-Aktivität in Blättern analysiert. Dabei wurde in einigen Linien eine um bis zu sechsfach erniedrigte spezifische Citrat-Synthase-Aktivität verglichen mit den Kontrollpflanzen gemessen (z.B. TCSAS-14, TCSAS-17; TCSAS-26; TCSAS-43; TCSAS-48; vgl. Tabelle X).

Tabelle X

Linie	CS-Aktivität [nmol CoA / min mg]	
Kontroll- pflanze	69,00	±21,20
TCSAS-14	35,87	±8,62
TCSAS-17	25,21	±7,12
TCSAS-26	11,63	±3,90
TCSAS-43	33,90	±8,30
TCSAS-48	16,25	±4,80

CS = Citratsynthase

Die hier dargestellten Enzymaktivitäten sind der Mittelwert von mindestens 18 Messungen ausgehend von mindestens neun unabhängigen Pflanzen.

Die oben genannten Genotypen TCSAS-17 und TCSAS-26 wurden amplifiziert, und jeweils 6 Pflanzen wurden in ein Gewächshaus transferiert.

Überraschenderweise wurde festgestellt, daß die Samen der transgenen Pflanzen TCSAS-17 und TCSAS-26 reduzierte Mengen an Fettsäuren im Vergleich zu Kontrollpflanzen enthalten (vgl. Tabelle XI).

Tabelle XI

	wt [nmol/Samen]		t 17 [nmol/Samen]		t 26 [nmol/Samen]	
16.:0	15,42	±2,96	7,03	±1,74	9,58	±1,37
18.:1	17,78	±4,12	6,88	±2,02	9,24	±2,29
18.:2	116,27	±17,66	63,25	±12,09	80,13	±14,74
18.:3	1,74	±0,38	1,23	±0,27	1,44	±0,27
Summe:	151,22	±25,11	78,39	±16,13	100,39	±18,68

Die angegebenen Werte stellen Mittelwerte sowie die Standardabweichungen aus jeweils 10 unabhängigen Messungen dar.

Die Analyse des Gewichtes von jeweils 200 Samen ergab, daß ein signifikanter Unterschied zwischen den Samen der transgenen Pflanzen TCSAS-17 und TCSAS-26 verglichen mit den Samen von Kontrollpflanzen bestehen (vgl. Tabelle XII).

Tabelle XII

	Samengewicht [µg pro Samen]	
Kontrollpflanze	90,5	±2,5
TCSAS-17	48,0	1,6
TCSAS-26	60,5	±5,5

Beispiel 6

Konstruktion des Pflanzentransformationsvektors pBin-USP-MTPHyInt

Für die Pflanzentransformation wurde die Codierregion des Acetyl-CoA-Hydrolase-Gens aus *Saccharomyces cerevisiae* mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR), wie in Beispiel 1 beschrieben isoliert.

Das Plasmid pAM-HyInt wurde mit Asp718 und HindIII geschnitten und das 1931 kb lange Fragment bestehend aus der Codierregion des Targetingpeptides der Kartoffel "Matrix processing peptidase" und der Codierregion für die Acetyl-CoA-Hydrolase aus *Saccharomyces cerevisiae* (mit inseriertem Intron) isoliert. Das so isolierte Fragment wurde in die Asp718/HindIII-Schnittstellen des binären Plasmides pUSP-Bin19 cloniert. Dieser Vektor enthält den USP-Promotor (Fiedler et al., Plant Mol. Biol. 22 (1993), 669-679), insbesondere das 684 bp lange PstI-Fragment aus pP30T, ein Kanamycinresistenzgen, eine Multiple-Cloning-Site und die Polyadenylierungsstelle des Octopinsynthase-Gens. Das resultierende Plasmid pBin-USP-MTPHyInt wurde für die Transformation von Raps wie oben beschrieben eingesetzt.

Beispiel 7

Konstruktion des Pflanzentransformationsvektors pBin-USP/Hyg-TP-ACS

Für die Pflanzentransformation wurde die Codierregion des Acetyl-CoA-Synthetase-Gens (De Virgilio et al., Yeast 8(1992), 1043-1051) aus *Saccharomyces cerevisiae* mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) ausgehend von genomische *S. cerevisiae* DNA mittels der Primer ACS1 (5'GAT CAA GCT TAT GTC GCC CTC TGC CGT ACA ATC -3'; Seq ID No. 7) und ACS2 (5'-GAT CAA GCT TTC ATC ATT ACA ACT TGA CCG ATC C-3', Seq ID No. 8) amplifiziert. Die Sequenz der Acetyl-CoA-Synthetase ist

in der GenEMBL Datenbank mit der Zugriffsnummer X66425 eingetragen. Die Clonierung des Acetyl-CoA-Synthetase Gens ist in De Virgilio (a.a.O.) beschrieben. Das amplifizierte Fragment entspricht der Region von den Nucleotiden 162 bis 2303 dieser Sequenz. Hierbei wurde am 5'-Ende und am 3'-Ende eine HindIII-Schnittstelle eingefügt. Das 2151 bp lange HindIII-Fragment wurde über die zusätzlichen Schnittstellen in die HindIII-Schnittstelle des Vektors pSK-TP cloniert. Dieses Plasmid enthält eine DNA-Sequenz, die das plastidäre Transitpeptid der Ferredoxin:NADP⁺-Oxireduktase aus Spinat codiert. Das Plasmid pSK-TP-ACS wurde mit Asp718 geschnitten, die Schnittstellen mit Hilfe der T4-DNA-Polymerase zu glatten Ende aufgefüllt und anschließend XbaI geschnitten. Das so isolierte 2380 kb lange Fragment bestehend aus der Codierregion des Targetingpeptides der Spinat Ferredoxin:NADP⁺-Oxireduktase und der Codierregion für die Acetyl-CoA-Synthetase aus *S. cerevisiae* wurde in die SmaI/XbaI-Schnittstellen des binären Plasmides pBin-USP-Hyg cloniert. Dieser Vektor enthält den USP-Promotor (684 PstI-Fragment aus pP30T (Fiedler et al., a.a.O.)). Das resultierende Plasmid pBin-USP/Hyg-TP-ACS wurde für die Transformation von Rapspflanzen, die eine Acetyl-CoA-Hydrolase aus Hefe (siehe Beispiel 4) exprimieren, wie oben beschrieben eingesetzt.

Beispiel 8

Konstruktion des Pflanzentransformationsvektors pBin-USP/Hyg-TP-ACLY

Für die Pflanzentransformation wurde die Codierregion des ATP:Citrat-Lyase-Gens aus *Rattus norvegicus* mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) ausgehend von cDNA aus *Rattus norvegicus* mittels der Primer ACLY1 (5'- ACT GAA GCC TAT GTC AGC CAA GGC AAT TTC AGA GCA-3', Seq ID No. 9) und ACLY2 (5'- ACT GAA GCC TTT ACA TGC TCA TGT GTT CCG GGA GAA C -3', Seq ID No. 10) amplifiziert. Die Sequenz der ATP:Citrat-Lyase ist in der GenEMBL Datenbank mit der Zugriffsnummer J05210

eingetragen. Die Clonierung des ATP:Citrat-Lyase-Gens aus *Rattus norvegicus* ist in Elshourbagy et al. (J. Biol. Chem. 265 (1990), 1430-1435) beschrieben. Das amplifizierte Fragment entspricht der Region von den Nucleotiden 73 bis 3375 dieser Sequenz. Hierbei wurde am 5'-Ende und am 3'-Ende eine HindIII-Schnittstelle eingefügt. Das 3312 bp lange HindIII-Fragment wurde über die zusätzlichen Schnittstellen in die HindIII-Schnittstelle des Vektors pSK-TP cloniert. Das Plasmid pSK-TP-ACLY wurde mit Asp718 geschnitten, mit Hilfe der T4-DNA-Polymerase zu glatten Ende aufgefüllt und anschließend mit XbaI geschnitten. Das so isolierte 3494 kb lange Fragment bestehend aus der Codierregion des Targeting-peptides der Spinat Ferredoxin:NADP⁺-Oxireduktase und der Codierregion für die ATP:Citrat-Lyase aus *Rattus norvegicus* wurde in die SmaI/XbaI-Schnittstellen des binären Plasmides pBin-USP-Hyg cloniert. Das resultierende Plasmid pBin-USP/Hyg-TP-ACLY wurde für die Transformation von Raps wie oben beschrieben eingesetzt.

Beispiel 9

Konstruktion des Pflanzentransformationsvektors pBin-USP-MTPCS

Für die Pflanzentransformation wurde die Codierregion des Citrat-Synthase-Gens aus *E. coli* mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) ausgehend von genomische *E. coli* DNA mittels der Primer CS1 (5'- A CTG GGA TCC ATG GCT GAT ACA AAA GCA AAA CTC ACC C -3', Seq ID No. 11) und CS2 (5'- A CTG GGA TTC TTA ACG CTT GAT ATC GCT TTT AAA G -3', Seq ID No. 12) amplifiziert. Die Clonierung und die Sequenz des Citrat-Synthase-Gens ist in Ner et al., Biochemistry 22 (1983), 5243-5249 beschrieben. Das amplifizierte Fragment entspricht der Codierregion von den Nucleotiden 1 bis 1284 dieser Sequenz. Hierbei wurde am 5'-Ende und am 3'-Ende eine BamHI-Schnittstelle eingefügt. Das 1294 lange BamHI-Fragment wurde über die zusätzlichen Schnittstellen in die BamHI-Schnitt-

stelle des Vektors pAM cloniert. Das Plasmid pAM-CS wurde mit Asp718 und HindIII geschnitten und mit der T4-DNA-Polymerase zu glatten Enden aufgefüllt und das 1393 kb lange Fragment bestehend aus der Codierregion des Targetingpeptids der Kartoffel "Matrix processing peptidase" und der Codierregion für die Citrat-Synthase aus *E. coli* isoliert. Das so isolierte Fragment wurde in die SmaI-Schnittstellen des binären Plasmides pUSP-Bin19 (siehe Beispiel 6) cloniert. Das resultierende Plasmid pBin-USP-MTPCS wurde einerseits für die Transformation von Tabakpflanzen und andererseits von Rapspflanzen wie oben beschrieben eingesetzt.

Beispiel 10

Transgene Pflanzen mit einer mitochondrialen Acetyl-CoA-Hydrolase und einer plastidären Acetyl-CoA-Synthetase

Pflanzen, die eine Acetyl-CoA-Hydrolase aus Hefe mit mitochondrialem Targeting und eine Acetyl-CoA-Synthetase aus Hefe mit plastidärem Targeting coexprimieren wurden regeneriert und im Gewächshaus angezogen. Die Samen dieser Pflanzen wurden wie oben beschrieben auf ihren Gesamtfettsäuregehalt hin untersucht. Es wurde eine Steigerung von ca. 5% bezüglich des Gesamtfettsäuregehaltes (pro Samen) im Vergleich zu nicht transformierten Pflanzen festgestellt.

Tabelle XIII

Linie	Fettsäuregehalt [nmol/Samen]	Δ Fettsäuregehalt [+/-]
Kontrolle	133	11
t1	144	12
t2	147	28
t3	145	17
t4	143	18
t5	146	12

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V.
- (B) STRASSE: keine
- (C) ORT: Berlin
- (E) LAND: Deutschland

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Transgene Pflanzenzellen und Pflanzen mit veränderter Acetyl-CoA-Bildung

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 12

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 40 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GTCAGGATCC ATGACAATTT CTAATTTGTT AAAGCAGAGA

40

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 40 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

GTCAGGATCC CTAGTCAACT GGTCCCGAGC TGTCGACCTT

40

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 24 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonucleotid"

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GTATACGTAA GTTCTGCTT CTAC

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 27 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonucleotid"

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

GTACAGCTGC ACATCAACAA ATTTTGG

27

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 31 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonucleotid"

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

GATCGGTACC ATGTACAGAT GCGCATCGTC T

31

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 31 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonucleotid"

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

GTACGGATCC CTTGTTGCA ACAGCAGCTG A

31

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 33 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonucleotid"

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

GATCAAGCTT ATGTCGCCCT CTGCCGTACA ATC

33

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 34 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonucleotid"

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

GATCAAGCTT TCATCATTAC AACTTGACCG ATCC

34

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 36 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonucleotid"

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

ACTGAAGCCT ATGTCAGCCA AGGCAATTTC AGAGCA

36

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 37 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonucleotid"
- (iii) HYPOTHETISCH: JA
- (iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

ACTGAAGCCT TTACATGCTC ATGTGTTCCG GGAGAAC

37

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 38 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonucleotid"
- (iii) HYPOTHETISCH: JA
- (iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

ACTGGGATCC ATGGCTGATA CAAAAGCAAA ACTCACCC

38

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 35 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonucleotid"

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

ACTGGGATTC TTAACGCTTG ATATCGCTTT TAAAG

35

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Transgene Pflanzenzelle mit einem veränderten Acetyl-CoA-Metabolismus, die aufgrund der Expression einer fremden DNA-Sequenz, die ein Protein mit Acetyl-CoA-Hydrolaseaktivität codiert, eine im Vergleich zu Wildtyp-Zellen erhöhte Acetyl-CoA-Hydrolaseaktivität aufweist.
2. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 1, worin die Acetyl-CoA-Hydrolaseaktivität in den Mitochondrien erhöht ist.
3. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 2, die weiterhin eine erhöhte Acetyl-CoA-Synthetaseaktivität im Cytosol aufweist.
4. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 1, worin die Acetyl-CoA-Hydrolaseaktivität im Cytosol erhöht ist.
5. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 2 oder 4, die weiterhin eine erhöhte Acetyl-CoA-Synthetaseaktivität in den Plastiden aufweist.
6. Transgene Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 1 bis 5, die weiterhin eine verringerte Citrat-Synthaseaktivität in den Mitochondrien aufweist.
7. Transgene Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 1 bis 5, die ferner eine erhöhte Citrat-Synthaseaktivität in den Mitochondrien oder dem Cytosol aufweist.
8. Transgene Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 1 bis 7, die weiterhin eine verringerte Aktivität der ATP-Citratlyase im Cytosol aufweist.

9. Transgene Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 1 bis 7, die weiterhin eine erhöhte Aktivität der ATP-Citratlyase im Cytosol aufweist.
10. Transgene Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die Acetyl-CoA-Hydrolase ein unreguliertes oder dereguliertes Enzym ist.
11. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 10, wobei die Acetyl-CoA-Hydrolase aus Pilzzellen stammt.
12. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 11, wobei die Acetyl-CoA-Hydrolase aus *Saccharomyces cerevisiae* stammt.
13. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 10, wobei die Acetyl-CoA-Hydrolase aus einem prokaryontischen Organismus stammt.
14. Transgene Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 3 oder 5 bis 13, wobei die Acetyl-CoA-Synthetase ein unreguliertes oder dereguliertes Enzym ist.
15. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 14, wobei die Acetyl-CoA-Synthetase aus einem Pilz, einem bakteriellen oder einem tierischen Organismus stammt.
16. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 15, wobei die Acetyl-CoA-Synthetase aus *Saccharomyces cerevisiae* stammt.
17. Pflanze enthaltend Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 1 bis 16.

18. Pflanze nach Anspruch 17, die mindestens eines der folgenden Merkmale aufweist:
 - (a) einen verringerten oder gesteigerten Gehalt an Fettsäuren im Blattgewebe oder im Samengewebe im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen;
 - (b) einen erhöhten Gehalt an löslichen Zuckern im Blattgewebe im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen;
 - (c) einen erhöhten Gehalt an Stärke im Blattgewebe im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen;
 - (d) verringertes Wachstum;
 - (e) Bildung von zwei oder mehr Sprossen;
 - (f) Veränderung der Blattfärbung.
19. Pflanze nach Anspruch 17 oder 18, die eine ölspeichernde Pflanze ist.
20. Vermehrungsmaterial einer Pflanze nach einem der Ansprüche 17 bis 19, das transgene Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 1 bis 16 enthält.
21. Vermehrungsmaterial nach Anspruch 20, das eine Frucht, ein Same oder eine Knolle ist.
22. Verwendung von DNA-Sequenzen, die ein Protein mit der enzymatischen Aktivität einer Acetyl-CoA-Hydrolase codieren, zur Expression in pflanzlichen Zellen, um die Aktivität der Acetyl-CoA-Hydrolase in pflanzlichen Zellen zu erhöhen.
23. Verwendung nach Anspruch 22, wobei die Acetyl-CoA-Hydrolaseaktivität im Cytosol erhöht ist.

1/5

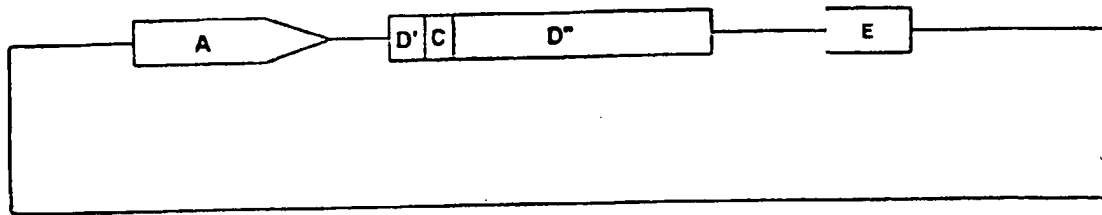


Fig. 1

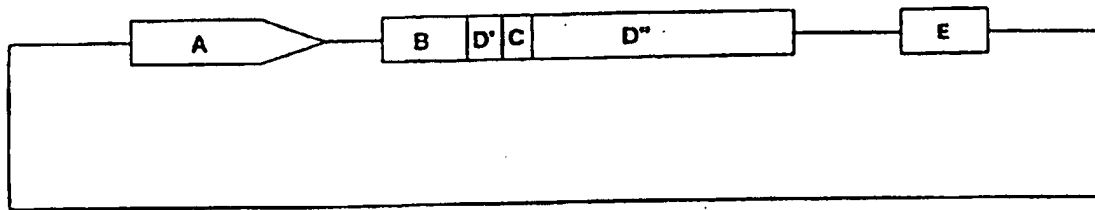


Fig. 2

2/5

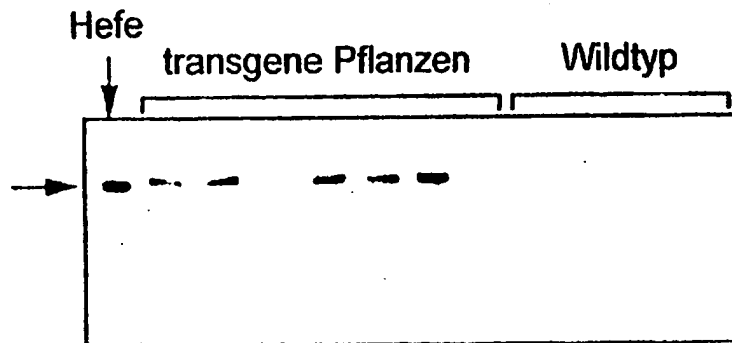


Fig. 3



Fig. 4

ERSATZBLATT (REGEL 26)

3/5

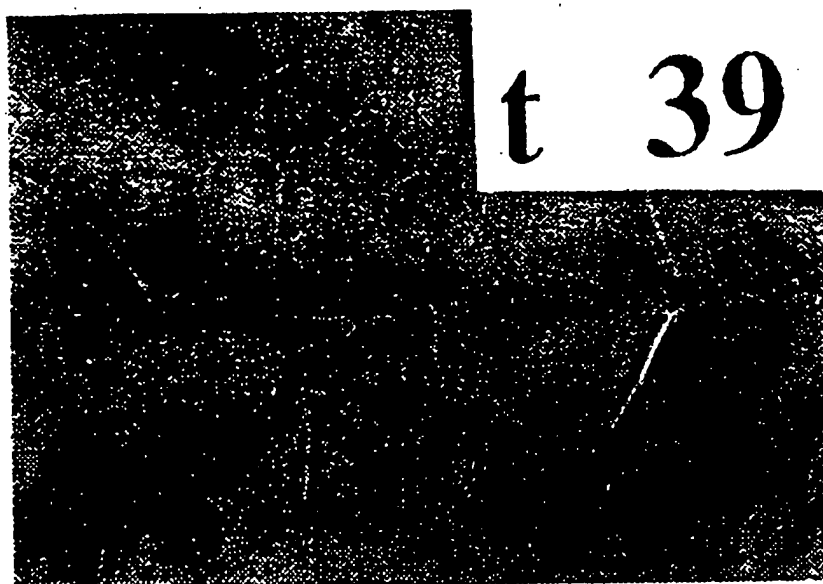


Fig. 5



Fig. 6

ERSATZBLATT (REGEL 26)

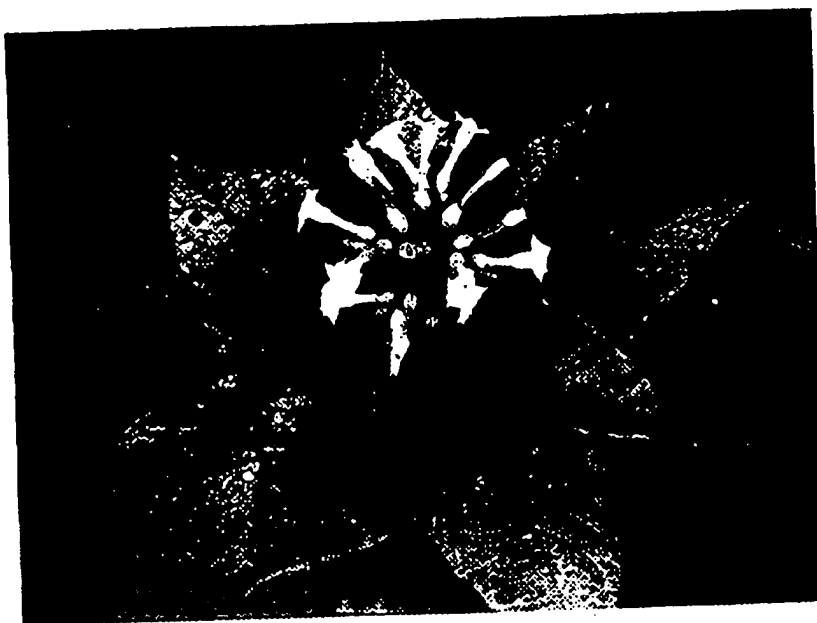


Fig. 7



Fig. 8

ERSATZBLATT (REGEL 26)

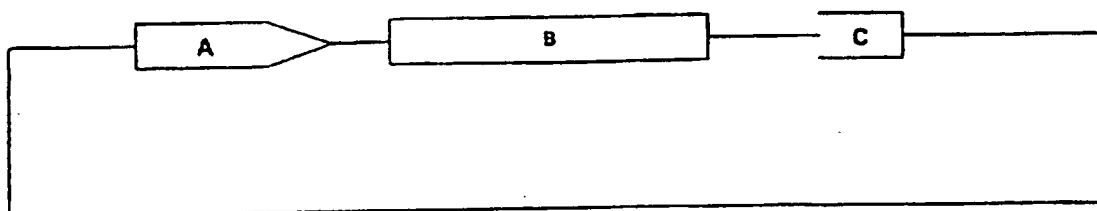


Fig. 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 97/04311

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N9/16 C12N15/82 //C12N9/00,C12N9/88,A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 348 958 A (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 3 January 1990 see page 1 - page 8 see page 15, line 15 - page 17, line 45 ---	1,10-12, 14-17, 19-23
A	KRATZER S ET AL: "Carbon source-dependent regulation of the acetyl-coenzyme A synthetase-encoding gene ACS1 from <i>Saccharomyces cerevisiae</i> " GENE., vol. 161, no. 1, 8 August 1995, AMSTERDAM NL, page 75-79 XP004042121 see the whole document ---	1,3,5

-/-

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 December 1997

Date of mailing of the international search report

14.01.98

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

De Kok, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 97/04311

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 95 24487 A (HOECHST SCHERING AGREVO GMBH) 14 September 1995 cited in the application see abstract ---	1,6,7
A	WO 95 20046 A (BIOCEM) 27 July 1995 see page 31, paragraph 2 ---	1
A	DE 43 17 260 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT) 28 July 1994 see the whole document -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 97/04311

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 6-9 partly
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Above-mentioned claims do not meet the requirements with regard to the technical description under PCT Article 6

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 97/04311

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0348958 A	03-01-90	AU 3849889 A	23-01-90
		DK 307390 A	12-02-91
		WO 9000003 A	11-01-90
		US 5487990 A	30-01-96

WO 9524487 A	14-09-95	DE 4408629 A	14-09-95
		DE 4435366 A	28-03-96
		DE 4438821 A	25-04-96
		AU 2067995 A	25-09-95
		CA 2184741 A	14-09-95
		EP 0748381 A	18-12-96
		HU 76093 A	30-06-97

WO 9520046 A	27-07-95	FR 2715404 A	28-07-95
		AU 1576395 A	08-08-95
		ZA 9500591 A	10-01-96

DE 4317260 A	28-07-94	CA 2150678 A	04-08-94
		WO 9417188 A	04-08-94
		EP 0680511 A	08-11-95
		JP 8509116 T	01-10-96

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. Aktenzeichen

PCT/EP 97/04311

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12N9/16 C12N15/82 //C12N9/00,C12N9/88,A01H5/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole)

IPK 6 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 348 958 A (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 3. Januar 1990 siehe Seite 1 - Seite 8 siehe Seite 15, Zeile 15 - Seite 17, Zeile 45	1,10-12, 14-17, 19-23
A	--- KRATZER S ET AL: "Carbon source-dependent regulation of the acetyl-coenzyme A synthetase-encoding gene ACS1 from Saccharomyces cerevisiae" GENE., Bd. 161, Nr. 1, 8. August 1995, AMSTERDAM NL, Seite 75-79 XP004042121 siehe das ganze Dokument --- -/-	1,3,5

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

16. Dezember 1997

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

14. 01 98

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentkan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bevollmächtigter

De Kok, A

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. nales Aktenzeichen

PCT/EP 97/04311

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 95 24487 A (HOECHST SCHERING AGREVO GMBH) 14.September 1995 in der Anmeldung erwähnt siehe Zusammenfassung ---	1,6,7
A	WO 95 20046 A (BIOCEM) 27.Juli 1995 siehe Seite 31, Absatz 2 ---	1
A	DE 43 17 260 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT) 28.Juli 1994 siehe das ganze Dokument -----	1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

1. nationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/04311

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
 weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☒ Ansprüche Nr. 6-9 teilweise
 weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
 Die oben angegebenen Ansprüche entsprechen nicht den Anforderungen zur technischen Beschreibung gemäß Art. 6 PCT.
3. ☐ Ansprüche Nr.
 weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat. Aktenzeichen

PCT/EP 97/04311

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0348958 A	03-01-90	AU 3849889 A DK 307390 A WO 9000003 A US 5487990 A	23-01-90 12-02-91 11-01-90 30-01-96
WO 9524487 A	14-09-95	DE 4408629 A DE 4435366 A DE 4438821 A AU 2067995 A CA 2184741 A EP 0748381 A HU 76093 A	14-09-95 28-03-96 25-04-96 25-09-95 14-09-95 18-12-96 30-06-97
WO 9520046 A	27-07-95	FR 2715404 A AU 1576395 A ZA 9500591 A	28-07-95 08-08-95 10-01-96
DE 4317260 A	28-07-94	CA 2150678 A WO 9417188 A EP 0680511 A JP 8509116 T	04-08-94 04-08-94 08-11-95 01-10-96